



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Biotecnología embrionaria:
Transferencia de embriones en
ganado vacuno

FÁTIMA VEGA GARCÍA GASCÓN

Grado en Veterinaria

Año 2021

Modalidad del Trabajo: Revisión Bibliográfica

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Fátima Vega García Gascón y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



Resumen

La reproducción es el sostén de la producción animal por ello, se han desarrollado y perfeccionado diversas técnicas de reproducción asistida como la transferencia de embriones. Gracias a esta biotecnología es posible incrementar el rendimiento económico de las explotaciones al permitir obtener un gran número de crías de animales genéticamente superiores. Asimismo, mover embriones parece ser, desde el punto de vista sanitario, la forma más segura de transportar material genético.

El objetivo de los programas de transferencia embrionaria es recuperar el mayor número de embriones posibles en un solo ciclo estral, por ello se realiza la estimulación ovárica de la hembra donante con el fin de producir la ovulación de varios ovocitos, en lugar de la ovulación simple característica de la especie bovina.

Los embriones recolectados pueden ser transferidos a la receptora de forma inmediata o conservarse durante un periodo prolongado a bajas temperaturas. Si se transfieren de forma inminente y, con el objetivo de maximizar la supervivencia de los mismos, es necesario realizar la sincronización artificial de los ciclos estrales entre la hembra donante y receptora. Para ello, se utilizan distintos protocolos hormonales con prostaglandinas y sus análogos, o con dispositivos intravaginales de liberación lenta de progesterona.

Para el almacenamiento de embriones durante periodos prolongados, se recurre a la criopreservación, proceso mediante el cual las células o tejidos se conservan a bajas temperaturas, paralizando su actividad metabólica. A pesar de tratarse de un método muy utilizado, es un procedimiento complejo y por ello, está siendo reemplazado por otra técnica mucho más sencilla y efectiva, la vitrificación. Con ella, se consigue deshidratar al embrión a través de un medio muy concentrado lográndose una gran viscosidad y evitándose así la formación de cristales de hielo intracelulares. Sin embargo, las tasas de gestación siguen siendo inferiores a las obtenidas al transferir embriones frescos, para tratar de solventar este problema, se están desarrollando nuevas técnicas como la blastocentesis.

Palabras clave: bovino, reproducción, MOET, hembra donante, hembra receptora, superovulación, sincronización, criopreservación

Resumo

A reprodución é o alicerce da produción animal, polo tanto, desenvolvéronse e perfeccionáronse varias técnicas de reprodución asistida como a transferencia de embrións. Grazas a esta biotecnoloxía é posible aumentar o rendemento económico das explotacións ao permitir obter un gran número de descendentes xeneticamente superiores. Do mesmo xeito, o movemento de embrións parece ser, desde o punto de vista da saúde, o xeito máis seguro de transportar material xenético.

O obxectivo dos programas de transferencia de embrións é recuperar o maior número de embrións posibles nun só ciclo estral, por este motivo realízase a estimulación ovárica da femia doadora co fin de producir a ovulación de varios ovocitos, en lugar da ovulación simple característica da especie bovina.

Os embrións recollidos pódense transferir ao destinatario inmediatamente ou almacenalos durante un longo período a baixas temperaturas. Se son transferidos de xeito inminente e, para maximizar a súa supervivencia, é necesario sincronizar artificialmente os ciclos estrais entre a femia doadora e a receptora. Para iso, úsanse diferentes protocolos hormonais con prostaglandinas e os seus análogos ou con dispositivos intravaxinal de liberación lenta de proxesterona.

Para o almacenamento de embrións durante períodos prolongados úsase a crioconservación, proceso polo cal as células ou tecidos se manteñen a baixas temperaturas, paralizando os seus procesos metabólicos. A pesar de ser un método moi utilizado, é un procedemento complexo e, polo tanto, está a ser substituído por outra técnica moito máis sinxela e eficaz, a vitrificación. Con el, o embrión deshidrátase a través dun medio altamente concentrado, logrando unha alta viscosidade e evitando así a formación de cristais de xeo intracelulares. Non obstante, as taxas de xestación son aínda máis baixas que as obtidas ao transferir embrións frescos, para tratar de resolver este problema estanse a desenvolver novas técnicas como a blastocentesis.

Palabras clave: bovina, reprodución, MOET, femia doante, femia receptora, superovulación, sincronización, crioconservación

Abstract

Reproduction is the mainstay of animal production, therefore, various assisted reproduction techniques such as embryo transfer have been developed and perfected. This biotechnology makes it possible to increase the economic performance of farms by allowing a large number of genetically superior offspring to be obtained. Likewise, moving embryos seems to be, from a health point of view, the safest way to transport genetic material.

The objective of embryo transfer programs is to recover as many embryos as possible in a single estrous cycle, for this reason ovarian stimulation of the donor female is performed in order to produce ovulation of several oocytes, instead of the simple ovulation characteristic of the bovine species.

The collected embryos can be transferred to the recipient immediately or stored for a long period at low temperatures. If they are transferred immediately, in order to maximize their survival, it is necessary to artificially synchronize the estrous cycles between the donor and recipient female. For this, different hormonal protocols are used with prostaglandins and their analogues, or with intravaginal slow-release progesterone devices.

For the storage of embryos for prolonged periods, cryopreservation is used, a process by which cells or tissues are kept at low temperatures, paralyzing their metabolic processes. Despite being a widely used method, it is a complex procedure and therefore it is being replaced by another much simpler and more effective technique: vitrification. With it, the embryo is dehydrated through a highly concentrated medium, achieving a high viscosity and thus avoiding the formation of intracellular ice crystals. However, gestation rates are still lower than those obtained when transferring fresh embryos, to try to solve this problem, new techniques such as blastocentesis are being developed.

Keywords: reproduction, cattle, MOET, donor cow, recipient cow, superovulation, synchronization, cryopreservation

Índice

Resumen	3
Resumo	4
Abstract	5
Abreviaturas	9
Introducción y objetivos	10
Material y métodos	13
Exposición del tema	14
<i>Historia y perspectivas</i>	14
<i>Aplicaciones</i>	16
<i>Etapas</i>	22
1. <i>ELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA HEMBRA DONANTE</i>	22
2. <i>ELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA HEMBRA RECEPTORA</i>	24
3. <i>SUPEROVULACIÓN, DETECCIÓN DEL CELO E INSEMINACIÓN DE LA DONANTE</i> 26	
4. <i>RECOGIDA, EVALUACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES</i>	31
5. <i>SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS</i>	37
6. <i>CONSERVACIÓN DE EMBRIONES</i>	39
7. <i>TRANSFERENCIA DE LOS EMBRIONES A LA HEMBRA RECEPTORA</i>	41
Conclusiones	43
Bibliografía	44

Índice de figuras

<i>Figura 1:</i> Protocolo de superestimulación desarrollado por Bo et al., (1995) en la Universidad de Saskatchewan, Canadá.....	28
<i>Figura 2:</i> Se observa un ovario de vaca superovulado (día 8) con múltiples cuerpos lúteos.....	30
<i>Figura 3:</i> Imagen ecográfica de un ovario de vaca superovulado donde podemos observar múltiples folículos.....	30
<i>Figura 4:</i> Sonda Foley empleada para el lavado de la luz uterina y recogida de los embriones.....	33
<i>Figura 5:</i> Embriones con código de calidad 1. (a) En etapa de desarrollo 4: mórula; (b) En etapa de desarrollo 5: blastocisto temprano; (c) En etapa de desarrollo 6: blastocisto.....	35
<i>Figura 6:</i> Embriones con código de calidad 2. (a) En etapa de desarrollo 4: mórula; (b) En etapa de desarrollo 5: blastocisto temprano; (c) En etapa de desarrollo 7: blastocisto expandido.....	36
<i>Figura 7:</i> Embriones con código de calidad 3. (a), (b) y (c) En etapa de desarrollo 4: mórula.....	36
<i>Figura 8:</i> Embriones con código de calidad 4. (a) En etapa de desarrollo 1: sin fertilizar; (b) En etapa de desarrollo 1: sin fertilizar y degenerado (c) En etapa de desarrollo 2: embrión de 2 a 12 células degenerado.....	36
<i>Figura 9:</i> Representación esquemática de una pajuela con un embrión conservado en congelación para su posterior transferencia a una receptora.....	40
<i>Figura 10:</i> Transferencia del embrión a la hembra receptora. Se realiza la deposición del mismo en el cuerno uterino ipsilateral al CL.....	42

Índice de tablas

Tabla 1: Estadíos de desarrollo embrionario. Las mayores tasas de gestación se obtiene con mórulas compactas y blastocistos jóvenes, es decir, cuando han transcurrido 6-7 días después del estro (sombreado)34

Abreviaturas

AETE: Asociación de Transferencia de Embriones en Europa
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AHM: Hormona AntiMülleriana
BCS: Índice de Condición Corporal
BVDV: Virus de la Diarrea Vérica Bovina
CIDR: nombre comercial del dispositivo intravaginal con progesterona de Pfizer
CL: Cuerpo Lúteo
E₂: Estradiol
eCG o PMSG: Gonadotropina Coriónica Equina
FAO: Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura
Fr: French (unidad de medida)
FSH: Hormona Folículo Estimulante
GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropinas
HASAR: Comité Asesor de Salud y Seguridad
hMG: Gonadotropina Menopausica Humana
IA: Inseminación Artificial
IBR: Rinotraqueítis Infecciosa Bovina
IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones
LH: Hormona Luteinizante
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España
MOET: Múltiple Ovulación y Transferencia de Embriones
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal
oFSH: Hormona Folículo Estimulante Ovina
P₄: Progesterona
PBS: Buffer Fosfato Salino
pFSH: Hormona Folículo Estimulante Porcina
PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}
PIMX: Plan Integral de Mejora Genética
TE: Transferencia de Embriones
UTE Bos: Unidad de Transferencia Embrionaria de Bos
ZP: Zona Pelúcida

Introducción y objetivos

La transferencia embrionaria (TE) es una biotecnología reproductiva relativamente frecuente y extensamente utilizada en el ganado vacuno. Pese a que la denominación de esta técnica está ampliamente aceptada en la actualidad, comenzó denominándose trasplante de embriones. Sin embargo, tal designación no resultaba correcta pues según el diccionario de la RAE, el término trasplantar significa “*trasladar un órgano o un tejido vivo desde un organismo donante a uno receptor, para sustituir en este al que está enfermo o inútil*”, mientras que el término transferir denota “*pasar o llevar algo desde un lugar a otro*”. En 1988, un grupo de investigadores de la Universidad de Guelph en Canadá introdujeron el término MOET, siglas que corresponden a Múltiple Ovulación y Transferencia de Embriones (Tempelman y Burnside, 2010).

En los últimos años, la aplicación de principios científicos biológicos con fines industriales ha progresado notablemente, principalmente en el área de la genética molecular y la reproducción (Fuentes, 2015). El uso de tecnologías reproductivas ha abierto muchas vías de estudio, tratamiento y manipulación del fenómeno reproductivo permitiendo aumentar la eficiencia de los animales (Choudhary *et al.*, 2016). En este sentido, la técnica de reproducción más generalizada es la Inseminación Artificial (IA), sin embargo, solo permite “explotar” la genética de la línea paterna. Con la implementación de la TE es posible acelerar la ganancia genética con la contribución de ambos sexos (Colazo y Mapletoft, 2007). No obstante, aunque ofrece la posibilidad de intensificar la selección desde la hembra, por su complejidad, difícilmente puede sustituir a la IA (Espinosa, 2017).

Pese a ello, el uso de la TE está ampliamente difundido a nivel global y es considerada la biotecnología de la reproducción que más influencia ha tenido en la genética del ganado Holstein (Fuentes, 2015). Como se detallará en el presente trabajo, la TE consta de varias etapas que pueden resumirse en dos procesos principales, por un lado, la recolección de embriones del tracto reproductor de la hembra donante superovulada y por otro, la transferencia de los mismos al genital de las receptoras (Fuentes, 2015; Hernández, 2019).

De este modo, es posible aumentar el número de animales con una capacidad genética superior, mejorándose la eficiencia reproductiva al verse reducido el intervalo generacional y acelerado el proceso de selección (Fuentes, 2015). Debe tenerse en cuenta que por el método convencional de reproducción, el ganadero tiene que esperar entre 12,5 a 13 meses (valor óptimo del Intervalo entre Partos) para que nazca un ternero (Alvear, 2010), produciéndose una media de 8-10 terneros (Mebratu, Fesseha y Goa, 2020) por vaca a lo largo de toda su vida productiva. Pero

con la TE, es posible obtener 32 embriones por vaca en un solo año (Mebratu, Fesseha y Goa, 2020).

Pero sin duda, el uso más común de la TE en los programas de producción animal es el incremento del número de animales que presentan los llamados “genes deseables” en el rebaño (Colazo y Mapletoft, 2007; Uribe, 2018). El desarrollo de grupos de hembras de “élite” es posible gracias esta biotecnología. Aquellos criadores que tienen hembras cuya progenie es muy buscada y en consecuencia, fácilmente vendible, deciden utilizar a las madres exclusivamente en este tipo de programas (Colazo y Mapletoft, 2007). Además, los productores comerciales tanto de ganado de carne como de leche se pueden beneficiar con programas de TE bien diseñados, con criterios de selección apropiados a su medio ambiente y objetivos individuales (Colazo y Mapletoft, 2007).

Asimismo, se ha demostrado que este método de movimiento de material genético es un procedimiento valioso y seguro para la prevención de enfermedades infecciosas. La determinación de factores epidemiológicos ha permitido concluir que el movimiento de embriones es mucho más seguro que el traslado de animales vivos (Stringfellow, 2004, p. 221).

Por otro lado, “la habilidad de recolectar embriones antes de la implantación, conservarlos congelados durante extensos períodos de tiempo y después, descongelarlos, provee una alternativa a los medios convencionales de mejora genética” (Stringfellow, 2004, p.221). Es por ello, que la posibilidad de conservar en congelación a los embriones ha contribuido de forma drástica a la extensión de esta biotecnología (Espinosa, 2017).

Según el 28º informe anual de 2019 de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS), en el año 2018 se recolectaron un total de 1.499.367 embriones transferibles en ganado bovino. En cuanto al tipo, los embriones *in vivo* representaron el 31.3% (469.967) en comparación con el 68.7% (1.029.400) de los embriones *in vitro*.

En lo que respecta al continente europeo, según el informe de 2020 de la Asociación de Transferencia de Embriones en Europa (AETE), en el año 2019 se transfirieron un total de 124.986 embriones *in vivo* y 23.370 *in vitro* en el ganado bovino. Siendo Francia el país con mayor producción (casi 38.000 embriones en 2019), seguido por Alemania, Países Bajos e Italia. España mantiene un 7º lugar con 472 recogidas y 2.578 transferencias comunicadas en 2019.

Durante los últimos años, tal y como afirma Santiago Fuentes (2015, p. 34): “La TE en España ha ido desarrollándose poco a poco, aumentando tanto el número de ganaderos que la utilizan, como el de veterinarios que la practican”. En concreto, en Galicia se ha producido un gran

incremento de la actividad de transferencia embrionaria gracias a que la Xunta de Galicia estableció el Plan Integral de Mejora Genética (PIMX), creándose la Unidad de Transferencia Embrionaria de Bos (UTE Bos), máximo exponente del uso de esta biotecnología reproductiva no sólo en Galicia, sino probablemente en todo el territorio español (Martínez, 2008).

Todos estos datos estadísticos demuestran que se trata de una técnica plenamente consolidada con resultados más que aceptables. De ahí, que resulte de gran importancia conocer en qué consiste y sus diversas aplicaciones. Por consiguiente, **el objetivo** del presente trabajo es efectuar una revisión detallada y actualizada de la técnica de transferencia de embriones en el ganado vacuno, brindando un especial interés a:

- Conocer el origen y las primeras perspectivas de la técnica.
- Conocer sus distintas aplicaciones y limitaciones.
- Conocer paso a paso cómo se realiza y qué hacer para obtener el máximo rendimiento.

Material y métodos

Se realizó una revisión sistemática de artículos científicos y revisiones recientes sobre la transferencia de embriones en el ganado vacuno, utilizando principalmente el motor de búsqueda de Google Académico y consultando las bases de datos Pubmed, Dialnet y BioMed.

Para realizar las búsquedas se utilizaron distintas palabras clave, algunas de ellas mencionadas ya en el apartado “resumen”, y se usó como idioma principalmente el inglés seguido del español e italiano. El criterio de cribado fue la fecha de publicación, incluyendo aquellos documentos publicados más recientemente.

Para proceder a la selección, se revisaron los resúmenes y en caso necesario, los artículos completos con el fin de decidir si la información permitía o no lograr los objetivos pautados. Posteriormente, de cada uno de los artículos se recopiló la información que se consideró más interesante para la revisión, prestando especial atención a los datos relacionados con el origen, procedimientos y factores que afectan al éxito de los programas MOET.

También, cabe mencionar que de los artículos originales se extrajo información sobre autoría y revistas científicas que resultaron de gran utilidad para encontrar otros artículos de interés para esta revisión.

Exposición del tema

Historia y perspectivas

A pesar de que la transferencia de embriones parece una técnica novedosa, lleva utilizándose con asiduidad más de 40 años (García *et al.*, 2017). Durante este prolongado periodo ha sufrido una importante evolución técnica e histórica. De hecho, su origen se remonta hasta 1890 cuando Walter Heape (Heape, 1890, citado en Hasler, 2014, p. 152) realizó con éxito la primera transferencia de embriones de mamíferos. En este caso, se transfirieron dos embriones de conejo angora a una hembra belga inseminada, que posteriormente dio a luz a cuatro crías belgas y dos angora (Mapletoft, 2013). Sin embargo, no fue hasta 1951, sesenta años más tarde, cuando se reportó un progreso significativo en la tecnología básica de la TE, produciéndose la primera transferencia de embriones exitosa en ganado (Hasler, 2014). Este acotamiento tuvo lugar en Wisconsin, gracias a Willett *et al.*, (Willett *et al.*, 1951, citado en Hasler, 2014, p. 152) que consiguieron que naciera el primer ternero por transferencia de embriones después de la transferencia quirúrgica de un embrión de 5 días derivado de un matadero (Mapletoft, 2013).

Ya a principios de la década de 1970, la técnica había progresado considerablemente como para avalar la fundación de programas comerciales de TE en diversos países (Hasler, 2014). En este sentido, veterinarios privados y empresas comerciales desarrollaron dicha biotecnología para su uso comercial, llevando el método laboratorial al campo (Mapletoft y Bó, 2016).

En un primero momento, todas las transferencias que se llevaban a cabo eran realizadas con embriones frescos hasta que en 1972, Whittingham *et al.*, (Kanagawa, 1988, citado en Fernandez, 2014, p. 5) lograron el nacimiento de una cría de ratón tras haber mantenido el embrión en refrigeración por un largo periodo de tiempo. Dos años más tarde, en 1974, Wilmut y Rowson (Kanagawa, 1988, citado en Fernandez, 2014, p. 5) consiguieron un avance mayor para el desarrollo de esta biotecnología, al lograr que naciera el primer ternero después de la conservación en congelación del embrión.

Asimismo, la técnica de recuperación de embriones ha sufrido una importante evolución a lo largo del tiempo. De hecho, las primeras técnicas descritas fueron no quirúrgicas pero el escaso éxito logrado condujo a la recuperación de embriones de forma quirúrgica (Merlo, 2007). En un primer momento, el procedimiento más extendido fue por laparotomía, bajo anestesia general, lo cual imposibilitaba el uso de la TE a nivel de la industria láctea debido al gran volumen de la ubre de las vacas lecheras que obstaculizaba el acceso ventral medio al tracto reproductivo (Mapletoft, 2013). Más tarde, la técnica fue simplificada por Avery *et al.*, (1962) al transferir el

embrión a la receptora en pie, vía incisión del flanco (Fernandez, 2014, p. 8). A principios de la década de 1980, Mutter *et al.*, (1964) consiguieron el mayor logro al realizar con éxito la primera transferencia no quirúrgica atravesando el cervix con un catéter de inseminación (Fernandez, 2014, p. 8). El desarrollo de la técnica por vía vaginal supuso un gran avance y una contribución vital para el uso comercial de la TE (Martínez, 2008). Por consiguiente, actualmente, las recogidas de embriones con fines comerciales, se realizan por métodos no quirúrgicos al tratarse de un procedimiento mucho más rápido, sencillo y económico.

A pesar de todo ello, durante los últimos 30 años no se ha producido un aumento apreciable en el número de embriones transferibles por vaca superovulada (Hasler, 2014). Sin embargo, el conocimiento de la dinámica folicular y la aplicación de métodos de sincronización (Bó *et al.*, 2002), ha simplificado y facilitado la puesta en práctica de la técnica, lo que se traduce en una mayor producción de embriones por unidad de tiempo (Mapletoft, 2013). Hoy en día, a diferencia de lo que ocurría en el pasado, las hembras donante son superovuladas con más frecuencia (en ocasiones, cada 30 días) y en el caso de las receptoras, se ha hecho innecesaria la detección del celo (Bó *et al.*, 2002; Mapletoft, 2013).

Por otro lado, es oportuno señalar que con el propósito de establecer estándares de práctica para la utilización de esta biotecnología, en 1974, se fundó la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) estableciéndose su sede en Colorado (EE.UU.) (IETS, 2020). Posteriormente y de forma paulatina, se fueron fundando organizaciones regionales para brindar confianza dentro de cada país. En efecto, el principal propósito de estas asociaciones es fomentar la ciencia de la transferencia de embriones mediante una investigación más eficaz, la difusión de información y la cooperación con otras corporaciones con objetivos similares (IETS, 2020). Además, cuentan con programas de certificación que garantizan que los manipuladores de embriones sean técnica y éticamente competentes (Mapletoft, 2013; Mapletoft y Bó, 2016).

Aplicaciones

El objetivo de cualquier explotación ganadera es incrementar su producción de manera eficiente, aumentando la productividad *per cápita* sin que esto afecte de forma drástica a los costes (Monaco, 2020). En consecuencia, a lo largo de los años, se han ido desarrollando diferentes tecnologías reproductivas con este fin, como es el caso de la transferencia de embriones, la cual ha supuesto un éxito comercial debido a sus numerosas aplicaciones:

- **Mejora genética:**

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los principales objetivos de la TE es tratar de superar el limitado progreso genético de la especie bovina debido principalmente a dos circunstancias. Por un lado, la baja tasa reproductiva lo que se traduce en un escaso número de descendientes al final de su vida reproductiva, y por otro lado, el largo intervalo intergeneracional ya que desde el nacimiento hasta que tiene lugar el primer parto suelen transcurrir una media de 24 meses (Seidel y Moore, 2005). Por ello, gracias a los programas MOET es posible aumentar la intensidad de selección, reduciendo el intervalo intergeneracional y aumentando en consecuencia, el progreso genético (Merlo, 2007).

En este sentido, el éxito de los programas MOET ha llevado a utilizar esta biotecnología para la selección de toros destinados a la producción de semen (Mapletoft, 2013; Mebratu *et al.*, 2020). Con este fin, se seleccionan hembras a las cuales se superovula e insemina con semen de toros que a su vez están altamente seleccionados. La descendencia masculina permanecerá en espera, mientras que la descendencia femenina entra en producción. Posteriormente, se prueba a los toros utilizando los datos productivos de sus hermanas, esto permite obtener valores reproductivos razonablemente fiables a una edad más temprana (FAO, 2010). En la práctica, esto significa que es posible probar genéticamente un toro a los tres años y medio, en comparación con los esquemas tradicionales de pruebas de progenie que requieren esperar cinco años y medio para poder seleccionar a los machos (Merlo, 2007). Consecuentemente, realizar la “prueba de hermanas” reduce la precisión de selección, sin embargo, este hecho se ve compensado por los intervalos generacionales más cortos (FAO, 2010), produciéndose ganancias genéticas que se acercan al doble de las logradas con los test de progenie tradicionales (Mapletoft, 2013; Mebratu *et al.*, 2020). Por tanto, la industria ganadera comercial se ha visto beneficiada por el uso de toros “producidos” mediante programas MOET bien diseñados (Mapletoft, 2013; Mebratu *et al.*, 2020).

Además, la aplicación de los programas MOET permite obtener un elevado número de descendientes por unidad de tiempo a partir de hembras con un mayor potencial genético (García *et al.*, 2017; Faizah *et al.*, 2018), contribuyendo así en el proceso de selección de la especie, no tanto como sucede en caso del macho, pero mucho más que si se utilizan como reproductoras. De hecho, se ha estimado que la obtención de seis descendientes por vaca donante podría duplicar la intensidad y la tasa de respuesta a la selección genética para rasgos como el crecimiento, que se pueden determinar en ambos sexos (Colazo y Mapletoft, 2007; Mebratu *et al.*, 2020). Por todo ello, el análisis genómico se ha vuelto esencial y, cada vez se están utilizando nuevas tecnologías de secuenciación y genotipado del ADN que permiten seleccionar a las hembras donantes de embriones (Mapletoft, 2013; Mebratu *et al.*, 2020).

- **Rescate genético de individuos valiosos:**

Gracias a la TE, es posible, aunque las tasas de éxito son bajas, obtener descendencia de vacas genéticamente valiosas que a causa de un traumatismo, enfermedad o envejecimiento se han vuelto infértiles (Seidel y Moore, 2005; Faizah *et al.*, 2018; Mebratu *et al.*, 2020). En estos casos, la elección del procedimiento de superovulación y de recuperación varía según el tipo de infertilidad (por ejemplo, en casos de piómetra persistente en los que se acumulan grandes volúmenes de exudados y detritos dentro de la luz uterina, resulta eficaz enjuagar el útero con NaCl al 0.9% hasta que el líquido recuperado sea transparente y luego administrar una prostaglandina (PGF_{2α})) (Seidel y Moore, 2005)

También, es posible recuperar ovocitos de vacas de alto valor genético que se encuentran en etapa terminal o en matadero, fertilizarlos *in vitro*, cultivarlos hasta la etapa inicial de blastocisto y transferirlos a una hembra receptora (Seidel y Moore, 2005; Mebratu *et al.*, 2020).

- **Controlar la transmisión de enfermedades:**

Es importante señalar, que la TE implica el mismo riesgo de transmisión de enfermedades genéticas que el involucrado en la IA o en la monta natural (Mebratu *et al.*, 2020), sin embargo, resulta de utilidad en lo que respecta al control de las mismas. Por ejemplo, en el caso de la sindactilia, es posible su control mediante la biopsia y el cariotipado de los embriones cuyos padres presentan cariotipos indeseables (características mendelianas recesivas), y solo los “normales” deberían ser utilizados para la transferencia.

En lo que concierne a la transmisión de enfermedades infecciosas, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) afirma que “la transferencia de embriones recolectados *in vivo* es un método de intercambio de material genético que entraña muy poco riesgo”, siempre que los embriones hayan sido obtenidos, procesados y almacenados por un equipo autorizado y se sigan estrictamente los protocolos sanitarios recomendados por la IETS (Fuentes, 2015). Se ha demostrado que cuando las recomendaciones de manejo de embriones son seguidas de forma adecuada, el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas es inexistente (Colazo y Mapletoft, 2007; Mapletoft, 2013). A este efecto, en el Manual de IETS, Stringfellow (2004, pp 221-222) detalla los factores de resistencia que permiten que el embrión sea un objetivo poco alcanzable para muchos agentes patógenos:

Esto es gracias a factores de resistencia primarios como la zona pelúcida (ZP) y el trofotodermo y, factores de resistencia secundarios como estadios tempranos de desarrollo, pequeño tamaño, y movilidad limitada que sirven para reducir la exposición potencial del embrión. Asimismo, las bacterias y los virus no sobreviven bien en los medios de cultivo embrionarios y además, debido a su tamaño, muchos son incapaces de penetrar la zona pelúcida, por lo que se reduce la posibilidad de transmisión de un agente infeccioso vía transferencia embrionaria.

No obstante, la IETS ha categorizado los agentes patógenos basándose en el riesgo de transmisión por un embrión bovino (Escobar, 2018; Zanrosso, 2019) :

La *categoría 1* incluye agentes patógenos para los que existen pruebas suficientes de que el riesgo de transmisión de la enfermedad es insignificante, siempre que los embriones se manipulen adecuadamente entre la recolección y la transferencia de acuerdo con el Manual de la IETS. Las enfermedades o patógenos incluidos en este grupo son la leucosis bovina enzoótica, la fiebre aftosa, la lengua azul, *Brucella abortus*, rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), *Haemophilus somnus*, campilobacteriosis genital bovina, tricomoniasis, leptospira, clamidia, infección genital por micoplasma y la encefalopatía espongiiforme bovina.

Las enfermedades de la *categoría 2* son aquellas para las que se han acumulado pruebas sustanciales que demuestran que el riesgo de transmisión es insignificante siempre que los embriones se manipulen adecuadamente entre recolección y transferencia de acuerdo con el Manual IETS, pero para los cuales se requieren transferencias adicionales para verificar los datos existentes. En esta categoría no se incluyen patógenos bovinos.

Las enfermedades o agentes patógenos de la *categoría 3* son aquellos para los que existen pruebas iniciales que demuestran que el riesgo de transmisión es insignificante siempre que los embriones se manipulen adecuadamente entre la recolección y transferencia de acuerdo con el Manual IETS, pero para los que se requiere información experimental adicional tanto *in vitro* como *in vivo* para corroborar los hallazgos iniciales. Las enfermedades o patógenos incluidos en este grupo son el virus de la diarrea vírica bovina, virus de la peste bovina, *Mycobacterium paratuberculosis*.

Las enfermedades o agentes patógenos de la *categoría 4* son aquellos para los que no se han realizado estudios o están en curso, y estos indican que aún no se pueden sacar conclusiones con respecto al nivel de riesgo de transmisión o el riesgo de transmisión a través de la transferencia podría no ser insignificante incluso si los embriones son debidamente manipulados de acuerdo con el Manual de la IETS. Las enfermedades o patógenos incluidos en este grupo son la anaplasmosis bovina, fiebre Q, *Chlamydia psittaci*, *Mycobacterium bovis*, *Trichomonas foetus*.

Cabe señalar que las cuatro categorías mencionadas solo consideran embriones producidos *in vivo* y no aquellos producidos *in vitro* (Escobar, 2018). De hecho, ninguna de las enfermedades infecciosas mencionadas ha sido transmitida por embriones *in vivo* (Mapletoft, 2013). En un estudio realizado por Brock *et al.*, (Escobar, 2018) se demostró que los embriones *in vivo* de vacas infectadas persistentemente por el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) se pueden lavar eficazmente para liberarlos del virus (la integridad de la ZP debe confirmarse antes y después del lavado) y transferirlos de forma segura a las hembras receptoras sin seroconversión. Sin embargo, es importante puntualizar que la situación difiere cuando se trata de embriones producidos *in vitro*, pues existen evidencias preliminares que indican que las recomendaciones de la IETS para el manejo de embriones producidos *in vivo*, no son eficaces para eliminar los patógenos de la ZP de aquellos producidos *in vitro* (Escobar, 2018), siendo más probable que estos permanezcan adheridos después del lavado (Mapletoft, 2013). En definitiva, se ha sugerido que la transferencia con embriones producidos *in vivo* puede utilizarse para salvaguardar la genética ante un brote, lo que podría ser una alternativa útil para establecer rebaños libres de enfermedades (Mapletoft, 2013; Mebratu *et al.*, 2020).

- **Expansión rápida del patrimonio genético y fácil transporte del genoma**

La capacidad de utilizar embriones para prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas los hace ideales para el movimiento internacional de germoplasma animal. Asimismo, la TE presenta otros beneficios adicionales al permitir que la genética original permanezca dentro del país exportador, evita la necesidad de un periodo de cuarentena y favorece la aclimatación de las razas al nuevo ambiente (Mapletoft, 2013).

Además, el transporte intercontinental de embriones congelados es mucho más rentable económicamente que el transporte de animales vivos (se pueden transportar grandes cantidades de embriones en un reducido volumen). Por tanto, la importación-exportación de embriones constituye hoy en día una de las formas más económicas y seguras de mover material genético por todo el mundo (Zanrosso, 2019).

- **Mayor número de crías por gestación:**

Los partos gemelares en la producción de vacuno de carne podrían ofrecer grandes ventajas económicas cuando la nutrición no es un factor limitante (Mebratu *et al.*, 2020). Sin embargo, por el momento, transferir dos embriones a una misma hembra receptora resulta complejo y costoso y en consecuencia, no es rentable económicamente. Una empresa de este tipo tendría que depender de grandes volúmenes de producción de embriones y de la prestación de servicios de TE a muy bajo coste, por ejemplo, mediante sistemas similares a los programas de inseminación artificial (Seidel y Moore, 2005).

- **La TE como parte de otras biotecnologías:**

La transferencia de embriones resulta eficaz en la detección de vacas y toros portadores de rasgos mendelianos recesivos indeseables (Seidel y Moore, 2005). Para ciertos rasgos como la sindactilia o el enanismo, hay un escaso número de hembras homocigóticas fértiles que podrían usarse para el cruce con toros portadores sospechosos (Mebratu *et al.*, 2020). En este sentido, la TE permite amplificar la producción de embriones de tales hembras, de modo que los toros puedan ser evaluados para determinar el estado de “portadores”. Y, además, también proporciona un método de prueba de las hijas de dichos toros para determinar qué mitad no presentan el alelo deletéreo (Seidel y Moore, 2005; Mebratu *et al.*, 2020). Tal y como Seidel y Moore (2005) afirman:

Para determinar si un animal es portador o no (con un 99% de seguridad) se requiere que al menos 7 generaciones resulten “negativas al defecto”, esto normalmente tomaría más tiempo que el promedio de vida reproductiva de una hembra bovina. Además, todos los terneros producidos durante la prueba serían portadores debido al uso de semen de un toro doble recesivo. Con la superovulación y la TE, uno o dos ciclos son suficientes para proporcionar los embriones necesarios para probar a la mayoría de las hembras y, además, si los fetos portan algún defecto este podría ser diagnosticado a los dos meses de gestación. Por lo tanto, con la TE es posible una respuesta rápida a un problema que de otro modo sería intratable.

También, es posible combinar la TE con otras biotecnologías como la fecundación *in vitro*, bisección de embriones, producción de animales transgénicos, sexado o clonación. El hecho de poder combinar la TE con semen sexado va a facilitar la obtención de individuos del sexo deseado para la selección con una eficacia del 90% (García *et al.*, 2017).

Como se puede apreciar, la TE posee numerosas virtudes, sin embargo, es importante señalar que también tiene ciertas **limitaciones**:

La principal limitación es el reducido número de embriones transferibles por recogida, el cual permanece estabilizado en un rango de seis a siete con ligeras diferencias entre las hembras de aptitud cárnica (6,8 embriones/recogida) y las de aptitud láctea (6,128 embriones/recogida) (García *et al.*, 2017).

La segunda gran limitación es su precio. Los costes de mano de obra y alimentación promediados sobre el número de terneros producidos son elevados (Mebratu *et al.*, 2020). A esto se suman el hecho de que se trata de un proceso lento que requiere dedicación y tiempo. En consecuencia, el uso rutinario de la TE en las explotaciones no resulta rentable y, por tanto, es una herramienta menos potente para el progreso genético que los programas de inseminación artificial, mucho más económicos (Seidel y Moore, 2005). Además, es importante tener en cuenta, que la TE en sí misma no mejora la calidad genética por ello, de base, las hembras donantes deben poseer una calidad genética superior.

Por último, la TE conduce a una reducción de la variabilidad genética debido a la reiterada utilización de los mismos genotipos.

Etapas

La TE es un proceso que depende de una serie de fases orquestadas secuencialmente por lo que un error en cualquiera de ellas va a influir negativamente en los resultados de la técnica (Monaco, 2020).

1. ELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA HEMBRA DONANTE

La hembra donante para poder ser superovulada es necesario que cumpla las disposiciones establecidas en la *Directiva 89/556/CEE* y el *Real Decreto 855/1992*, por el que se fijan las condiciones de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones procedentes de terceros países de embriones de animales domésticos de la especie bovina. Ambas normas hacen referencia a la sanidad de las explotaciones, donantes y embriones (Fuentes, 2015). Asimismo, tiene que cumplir una serie de requisitos generales descritos en el Manual de la IETS, como proceder o estar en explotaciones certificadas libres de tuberculosis, brucelosis, leucosis enzoótica bovina, perineumonía o cualquier otra enfermedad transmisible de los rumiantes, no habiéndose producido ningún caso de dichas enfermedades en un radio de 5 km (Alberio, 2004). Durante los 60 días previos a la colecta, la donante debe permanecer en un mismo lote y ningún animal podrá incorporarse al mismo. Además, no exhibirá evidencias clínicas de ningún proceso infeccioso en el momento de la recolección (Alberio, 2004).

Como norma general, un mes antes del inicio de la superovulación, las donantes no podrán ser vacunadas, no presentarán ningún proceso patológico y no deberán recibir ningún cambio en el manejo, pues cualquier modificación en su “rutina” puede suponer un retraso en el inicio de la superovulación y afectar en los resultados finales de la técnica (Fuentes, 2015).

Sin embargo, no hay ninguna normativa al respecto de los criterios en los que basarse para seleccionar hembras donantes. Las únicas limitaciones vienen determinadas por las exigencias impuestas por las asociaciones de algunas razas o por los intereses del ganadero (Selk, 2002). En primer lugar, es importante descartar aquellos animales con enfermedades de transmisión genética (Fuentes, 2015). No obstante, la mayoría de los programas de transferencia de embriones se basan en dos criterios generales para seleccionar hembras donantes (Mebratu *et al.*, 2020):

El primer criterio es en base a su mérito genético (Siqueira *et al.*, 2017) que contribuye favorablemente en el programa de selección de la raza (Mebratu *et al.*, 2020). Los índices genéticos nos indican lo que una vaca trasmite a su descendencia y, se refieren tanto a caracteres productivos (producción de leche, % de grasa, % de proteína), reproductivos (tasa de embarazo de las hijas), como a caracteres morfológicos (condición corporal (BCS), apariencia general, velocidad de crecimiento, sistema mamario, etc.) (Fuentes, 2015; Siqueira *et al.*, 2017). Es por ello, que los productores pueden diferir en su opinión respecto a los criterios para seleccionar una vaca genéticamente sobresaliente (Selk, 2002).

Con este objetivo, cada vez más, se están utilizando tecnologías de secuenciación y genotipado del ADN que nos permiten conocer las variantes a lo largo del genoma, las cuales son responsables de que unos animales sean más productivos que otros, tenga mejor conformación o más resistencia a ciertas enfermedades (González, Jiménez-Montero y Alenda, 2010; Fuentes, 2015). La finalidad es saber identificar cuales de estas variantes están asociadas a cada uno de los caracteres y cuál es su efecto sobre ellos (González, Jiménez-Montero y Alenda, 2010; Fuentes, 2015).

El segundo criterio de selección está directamente relacionado con el rendimiento de la técnica y se basa en la probabilidad de producir un elevado número de embriones transferibles (Monaco, 2020). Una vez elegidas las hembras genéticamente superiores se ha de valorar su historial reproductivo (Fuentes, 2015). Para ello, se analizan los antecedentes de fertilidad y fecundidad, estado sanitario (sana y libre de patologías) y la existencia de ciclos estrales normales y regulares. Asimismo, la hembra donante deberá encontrarse, al menos, en el día 60 postparto (Monaco, 2020).

En este sentido, sería interesante realizar una exploración exhaustiva de las donantes mediante exploración rectal y/o ecografía para valorar su estado ginecológico, confirmar la presencia de un cuerpo lúteo funcional y descartar posibles problemas reproductivos (Fuentes, 2015). Además, debería descartarse la presencia de adherencias o de lesiones palpables en el útero y los ovarios. También, es importante examinar con regularidad el canal cervical con un dilatador para verificar el paso del catéter, y evitar así posibles complicaciones a la hora de la recolección de embriones.

Finalmente, es fundamental mantener a las donantes en un nivel de nutrición apropiado para su tamaño y producción, teniendo en cuenta que los individuos excesivamente engrasados o delgados presentarán la fertilidad reducida (Selk, 2002; Seidel y Moore, 2005). Es por ello, que desde la década de 1990, se han introducido elementos nutricionales como proteínas, ácidos grasos, vitaminas o minerales para intentar mejorar la respuesta superovulatoria de la donante.

Sin embargo, la evidencia disponible indica que las estrategias de suplementación nutricional probadas no son un enfoque eficaz para mejorar el resultado de superovulación (Velazquez, 2011).

Las hembras donantes pueden encontrarse en un centro de transferencia de embriones bajo condiciones de manejo intensivo o en una granja de producción. Esta última alternativa resulta menos costosa, sin embargo, los resultados son ligeramente inferiores (Mebratu *et al.*, 2020).

2. ELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA HEMBRA RECEPTORA.

Se debe tener en cuenta que para garantizar el éxito de un programa de TE, tan importante es una adecuada selección y preparación de la donante como de la receptora.

Serán seleccionadas aquellas vacas reproductivamente sanas, con normalidad anatómica y funcional en su tracto genital, que exhiben facilidad de parto y que tienen una buena capacidad de ordeño y maternidad. Además, deben presentar una condición corporal satisfactoria y encontrarse en un sólido estado sanitario (Mebratu *et al.*, 2020). Asimismo, trabajar con receptoras dóciles y habituadas al manejo es una consideración importante a tener en cuenta para poder reducir al mínimo el estrés generado durante el tratamiento de sincronización y en el momento de la transferencia (Fuentes, 2015).

Un tema controvertido a considerar es la edad de la receptora. Algunos autores sostienen que los mejores resultados se obtienen cuando se utilizan novillas nulíparas (que hayan alcanzado un adecuado desarrollo) debido a que dan tasas de preñez más altas que las vacas (Martínez, 2008). Sin embargo, hay tener en cuenta que los problemas de manejo durante la transferencia, la gestación, el parto y la lactancia pueden producir resultados finales inferiores. Por otro lado, se encuentran los autores que consideran que las vacas multíparas son las receptoras óptimas (Palma, 2001; Alberio, 2004; Brito, 2012; Getachew, Lemma y Fesseha, 2020) puesto que cuentan con historial reproductivo conocido lo que garantiza en cierta manera su comportamiento futuro. Además, a esto se suma el hecho de que los problemas de parto son menores y la producción de leche es mejor (Getachew, Lemma y Fesseha, 2020). En este último caso, es importante que la vaca adulta haya tenido siempre buena fertilidad.

Asimismo, la receptora debe tener un tamaño adecuado para no presentar problemas al parto (Brito, 2012) el cual va a depender del tipo de embrión que se va a transferir. Tal y como, Palma (2001) afirma:

Uno de los errores más comunes es relacionar el tamaño de la receptora con el tamaño al nacimiento del embrión transferido, sin embargo, el peso de la cría está determinado genéticamente y en principio, se ve poco afectado por el ambiente uterino de la receptora.

A pesar de esta afirmación, en su libro *Bioteología de la reproducción*, relata que en algunos estudios realizados con animales de laboratorio y en observaciones empíricas provenientes de trabajos en bovinos, se ha podido demostrar que la interacción del ambiente uterino de la receptora con el genotipo del feto es mayor que la supuesta (Palma, 2001). Ciertamente, el concepto más importante a tener en cuenta es no transferir embriones que darán nacimiento a terneros de gran tamaño en vacas que son demasiado pequeñas (Palma, 2001; Alberio, 2004).

Por otro lado, es vital para el éxito de la TE, el programa de alimentación de la receptora pues va a gestar y amamantar a crías de alto valor genético (Getachew, Lemma y Fesseha, 2020). Ante esta consideración, la receptora gestante no ha de ser tratada como cualquier otra vaca de cría (Palma, 2001 ; Alberio, 2004). Debe evitarse que engorde demasiado ya que esto puede derivar en trastornos de la presentación del ciclo estral y por tanto, en la sincronización de celos, a esto se suma, el incremento del riesgo de sufrir enfermedades peripartales (como cetosis, hipocalcemia...) y complicaciones durante el parto (distocias) (Brito, 2012).

Por el contrario, la raza no es un factor importante a tener en cuenta, de hecho, es frecuente utilizar razas autóctonas o cruces, ya que generalmente se acepta que tienen mayor fertilidad y el valor genético de estas hembras carece de importancia (Brito, 2012).

Uno de los puntos críticos es dónde conseguir vacas receptoras. Lo más aconsejable es obtenerlas de la propia explotación pues van a presentar inmunidad a los patógenos locales que transferirán a sus crías, además del consiguiente conocimiento de su historia reproductiva (Alberio, 2004; Uribe, 2018). Asimismo, el estrés se verá reducido al haber sido criadas en el lugar. Si esta situación no es posible, la alternativa es comprar receptoras, lo cual exige ciertas precauciones. Sin duda, la tendencia general es adquirir vacas secas, por ello una buena opción es la compra de vacas lecheras de descarte por baja producción (Alberio, 2004).

Una vez seleccionada la hembra receptora debería ser sometida a un exhaustivo examen clínico, tanto general como ginecológico. Se tomarán muestras de sangre para determinar enfermedades endémicas en la región de compra y se harán las vacunaciones y desparasitaciones pertinentes. También, se deberá proceder a la detección del celo al menos dos veces al día y, si la vaca no fuese vista en celo en 25 días debería ser nuevamente explorada y se procedería de acuerdo al diagnóstico (Alberio, 2004).

3. SUPEROVULACIÓN, DETECCIÓN DEL CELO E INSEMINACIÓN DE LA DONANTE

En primer lugar, es importante conocer la fisiología del ciclo estral bovino, el cual consta de 2 o 3 oleadas de crecimiento folicular. Cada una de ellas, comienza con el reclutamiento de un grupo de folículos en crecimiento. Posteriormente, un grupo más reducido es seleccionado y finalmente, en la última oleada se desarrolla el folículo dominante o preovulatorio que va a provocar, debido a la secreción de estrógenos e inhibina, la regresión del resto de folículos “subordinados” como respuesta a la disminución de la concentración de la hormona folículo estimulante (FSH) (García *et al.*, 2017). Por consiguiente, la hembra bovina es una especie monoovular, por ello, si el óvulo que se produce en cada ciclo queda fecundado pasaría a producir un ternero al año (Ponce, 2015; Naranjo, 2019). Sin embargo, esto no resulta rentable para los programas MOET, cuyo objetivo es recuperar el mayor número posible de embriones en un solo ciclo estral. Para conseguirlo, es necesario evitar la dominancia y recurrir a la sobreestimulación ovárica de la donante con protocolos de superovulación que permiten aumentar la cantidad de ovocitos por ciclo y en última instancia, conducen a la producción de varios embriones a la vez (Lamb, Fontes, y Oosthuizen, 2019). Para poder inducir la ovulación múltiple, se utilizan hormonas gonadotropas exógenas estimulantes del folículo (Ponce, 2015):

Inicialmente, se utilizaba gonadotropina coriónica equina (eCG) o Pregnat Mare Serum Gonadotropin (PMSG). Se trata de una glicoproteína compleja con actividad estimulante del folículo y luteinizante (LH). Tiene una vida media aproximada de 40 horas en la vaca y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea; por esta razón, normalmente se administraba en una sola dosis intramuscular. La prolongada vida media de la eCG, provocaba varios problemas originados por la permanente estimulación ovárica como folículos anavulatorios o perfiles endocrinos anormales de LH y progesterona (P₄), cuyas consecuencias repercutían negativamente en el número y la calidad de los embriones transferibles obtenidos (Fuentes, 2015; Naranjo, 2019).

En la actualidad, la mayor parte de las vacas donantes son tratadas con gonadotropinas extraídas de la hipófisis de porcinos (pFSH) u ovinos (oFSH). Aunque el contenido mayoritario es FSH, cada preparado comercial tiene una diferente relación FSH/LH pudiendo oscilar entre 1 y 0,5, hecho que representa una fuente de variación en la respuesta superovulatoria (Mikkola, 2017). Tienen una vida media corta, por lo que se requieren aplicaciones cada 12 horas durante 4 o 5 días, lo cual puede suponer un problema con animales poco acostumbrados al manejo (Fuentes, 2015). Por ello, se han realizado una serie de experimentos con el fin de evaluar la viabilidad de la superestimulación con una sola inyección subcutánea de FSH y, los resultados fueron satisfactorios en las vacas de carne (Bó *et al.*, 1994; García *et al.*, 2017). Sin embargo, no se

repitieron con tanto éxito en vacuno de leche debido a su menor cantidad de tejido adiposo subcutáneo (García *et al.*, 2017; Mikkola, 2017). También es posible la superovulación dividiendo la dosis total en dos aplicaciones (dosis partida), de forma que el 75% de la misma se administra al iniciar el tratamiento (25% de la dosis total IM y el 50% SC) y el 25% restante, dos días más tarde por vía SC (García *et al.*, 2017; Mikkola, 2017). La respuesta en términos de ovulaciones y embriones fue numéricamente intermedia para el régimen de dosis dividida en comparación con el protocolo estándar de inyecciones múltiples o una sola inyección (Mikkola, 2017).

Elsden *et al.*, (1978) demostraron que con el uso del tratamiento de FSH se obtenía mayor respuesta de superovulación y mayor tasa de donadoras que producían más de tres embriones transferibles en comparación con la eCG (Naranjo, 2019). No obstante, el tratamiento de superestimulación combinando FSH para reclutar los folículos y después, eCG para estimular el crecimiento final de los mismos, es una alternativa muy sugerente para aumentar la respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones obtenidos (Fuentes, 2015). Además, para evitar los efectos adversos de la contaminación por LH, se ha probado la aplicación de FSH bovina de origen recombinante con resultados alentadores, lo que pone de manifiesto su futuro potencial (García *et al.*, 2017; Mikkola, 2017).

Como ya se ha mencionado, a través de los años, se han ido desarrollado diferentes protocolos de superovulación (Naranjo, 2019). El protocolo tradicional se basó originalmente en información anecdótica y experimental, en el cual se logró una mayor respuesta superovulatoria cuando los tratamientos con gonadotropinas fueron iniciados 8-12 días después de ser observado el celo (Carballo, 2012; García *et al.*, 2017). Hoy en día, gracias a la ecografía, se sabe que entre los días 8 y 12 es el momento en el que comienza, en la mayoría de las vacas, la segunda oleada folicular (Colazo y Mapletoft, 2007; Naranjo, 2019). También, se ha demostrado que la respuesta óvarica es óptima cuando el tratamiento es iniciado justo en el momento de emergencia de la oleada de crecimiento folicular (Colazo y Mapletoft, 2007; Carballo, 2012; García *et al.*, 2017). En consecuencia, la presencia de un folículo dominante al inicio del mismo provoca una disminución del 40-50% de la respuesta superovulatoria (Colazo y Mapletoft, 2007; Carballo, 2012).

Con el mayor conocimiento de la dinámica folicular, científicos de la Universidad de Saskatchewan en Canadá (Bó *et al.*, 1995) desarrollaron distintos protocolos que combinaban progestágenos y estradiol (E₂) (*Figura 1*). Estos permitían comenzar el tratamiento de superestimulación en el momento más idóneo, evitando la necesidad de detectar el celo y de esperar hasta la mitad del ciclo estral para iniciarlo (Colazo y Mapletoft, 2007; Naranjo, 2019). En este sentido, la inserción de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona el día cero

(CIDR-B o Crestar) y la administración de 2,5 a 5 mg de 17β -estradiol o 2 a 2,5 mg de benzoato de estradiol junto con 100 o 50 mg de progesterona intramuscular el mismo día (0), sincronizan eficazmente la oleada folicular, independientemente de la fase del ciclo en que se encuentre la donante, provocando la regresión de la onda folicular en curso al inducir la atresia de los folículos (Bó *et al.*, 2002; Fuentes, 2015; Naranjo, 2019). La nueva oleada emergerá a los 4,3 días de media (Fuentes, 2015), por lo que el día 4 después de la administración de E_2 y P_4 , se comenzará el tratamiento con FSH exógena (García *et al.*, 2017).

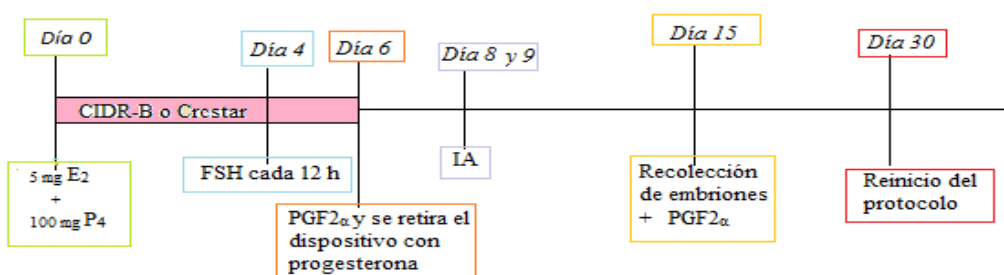


Figura 1: Protocolo de superestimulación desarrollado por Bó *et al.*, (1995) en la Universidad de Saskatchewan, Canadá (Elaboración propia).

El tratamiento con E_2 y P_4 ha sido utilizado durante años, sin embargo, la prohibición del uso de progesteronas inyectables y estrógenos por la posibilidad de su inclusión en la cadena alimentaria humana, obligó a pensar en nuevas alternativas para eliminar el efecto supresor del folículo dominante (Martínez, 2008; Fuentes, 2015).

Por ello, se desarrolló otro método eficaz, la punción trasvaginal guiada por ultrasonografía. En un primer momento, se eliminaban todos los folículos cuyo diámetro superaba los 5 mm, pero más tarde, se comprobó que con eliminar los dos folículos de mayor diámetro era suficiente para lograr el efecto deseado (Carballo, 2012; García *et al.*, 2017). Con esto, la nueva oleada de crecimiento folicular se inicia, aproximadamente, 1,5 días más tarde (Carballo, 2012), pudiéndose comenzar el tratamiento de superovulación uno o dos días después de la eliminación del folículo dominante (Carballo, 2012; Fuentes, 2015). Sin embargo, hay que reconocer que en condiciones de campo, es difícil determinar con un solo examen ultrasonográfico, si un folículo grande es funcionalmente dominante y si los folículos pequeños están en la fase de crecimiento activo o en la de atresia. No obstante, la presencia de más de seis folículos de 3-6 mm de diámetro junto a un folículo de mayor tamaño, 8-10 días postovulación, es indicativo de que está comenzado una nueva oleada folicular (Fuente, 2015). Otro gran inconveniente que presenta esta técnica y que la hace poco práctica a nivel de campo, es la necesidad de contar con un equipo de ultrasonografía y personal muy especializado para realizar dicha labor (Carballo, 2012; Fuente, 2015).

Otro método para promover el inicio de una oleada de crecimiento folicular es provocar la ovulación del folículo dominante administrando hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) consiguiéndose así, el inicio de una nueva onda folicular 1,5 a 2 días después (García *et al.*, 2017). El tratamiento de superovulación se puede comenzar a las 36 horas de la aplicación de la GnRH. Sin embargo, se ha visto que con este tratamiento, la oleada es sincronizada solamente cuando se provoca la ovulación del folículo dominante (Carballo, 2012). Por esta razón, la administración de GnRH a vacas cuya fase del ciclo se desconoce no resulta útil (García *et al.*, 2017). Otra posible alternativa, sería aplicar previamente alguno de los métodos utilizados para la sincronización de la ovulación de cara a la inseminación a tiempo fijo (García *et al.*, 2017). El protocolo recomendado por Carballo *et al.* (Carballo *et al.*, 2010, citado en García *et al.*, 2017, p.3) se basa en administrar $\text{PGF}_{2\alpha}$ al mismo tiempo que se coloca un dispositivo intravaginal de progesterona, siete días más tarde, manteniendo el dispositivo de progesterona, se administra GnRH para provocar la ovulación del folículo persistente y 36 horas más tarde se inicia el tratamiento con FSH.

Actualmente, el protocolo de superestimulación recomendado para las hembras donantes de *Bos taurus* implica la inserción de un dispositivo CIRD el día 0, seguido de una inyección de GnRH 2 días después (Lamb, Fontes y Oosthuizen, 2019). A partir del día 4, las donantes reciben dos inyecciones intramusculares diarias de FSH cada 12 horas durante cuatro días consecutivos (Naranjo, 2019; Mebratu *et al.*, 2020). La administración de FSH se realiza en dosis decrecientes cada día hasta el día 7, resultando un total de 8 inyecciones y 400 mg de FSH purificada (Lamb, Fontes y Oosthuizen, 2019). El día 7, para dar lugar a la regresión del CL, se administran 2 inyecciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ con un intervalo de 12 horas (Lamb, Fontes y Oosthuizen, 2019). En el momento de la segunda inyección de $\text{PGF}_{2\alpha}$, se retira el dispositivo CIRD produciéndose la caída de la concentración de progesterona en sangre. El celo tiene lugar a las 36-48 horas, y las ovulaciones comienzan 24-36 horas más tarde (García *et al.*, 2017). La recolección de embriones es realizada el día 15 del programa y los animales reciben una $\text{PGF}_{2\alpha}$ después del lavado. El día 30, se reinicia de nuevo el protocolo (Colazo y Mapletoft, 2007; Naranjo, 2019). Existen una gran diversidad de variantes a este esquema (retraso en la administración de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ hasta las 72-96 horas, alargamiento del periodo de administración de la FSH durante 7 días...) con diferentes resultados (García *et al.*, 2017). El uso de tratamientos prolongados con FSH se asocia con una mayor maduración del folículo y mejor capacidad para ovular (García *et al.*, 2015).

La superovulación sigue siendo el paso menos predecible en el proceso de transferencia de embriones (Monaco, 2020). La variabilidad individual en la respuesta a los protocolos es el factor limitante más importante que afecta a los resultados. Esta variabilidad se debe a factores

asociados con el tratamiento: tipo y pureza de la gonadotropina, dosis total administrada, momento del tratamiento con relación al ciclo estral y la duración del mismo, vía de administración y variaciones entre lotes (Fuentes, 2015; Mikkola, 2017). También, hay otros factores importantes que son inherentes al animal y a su ambiente que dan lugar a variaciones muy amplias en la respuesta a los protocolos: la edad, la raza, la estación del año, el estado nutricional, la historia reproductiva y el estado ovárico en el momento en el que se inicia tratamiento (Monaco, 2020). La influencia de todos estos factores justifica porqué las tasas de viabilidad se sitúan entre el 0 y 100% de los embriones recogidos de una donante (Fuentes, 2015).

Sin embargo, algunos investigadores han sugerido que la respuesta al tratamiento superovulatorio parece estar directamente condicionada por el número de folículos de más de 0,7 mm de diámetro que se encuentran en el ovario en el momento de iniciarlo (Monniaux *et al.*, 1983; García *et al.*, 2017). Este hecho abre la posibilidad de predecir la respuesta de una hembra donante, pudiéndose cuantificar mediante ecografía, el número de folículos ováricos que potencialmente van a responder al tratamiento con gonadotropinas (Mikkola, 2017). Asimismo, un método prometedor es la determinación de hormona anti-Mülleriana (AHM). Esta hormona, que en las hembras de ganado vacuno, se expresa exclusivamente en las células de la granulosa, puede usarse como un marcador endocrino para el tamaño de la población folicular antral y la predicción de la respuesta superovulatoria (Ireland *et al.*, 2011; Mikkola, 2017). Por lo que, determinar su concentración sérica permitirá conocer la cantidad de folículos que serán susceptibles a las gonadotropinas en el momento de iniciar el tratamiento y, así, predecir la respuesta en términos de número de ovulaciones, así como de embriones transferibles (Rico *et al.*, 2012; García *et al.*, 2017).



Figura 2: Se observa un ovario de vaca superovulado (día 8) con múltiples cuerpos lúteos (Fuentes, 2015, p.88).

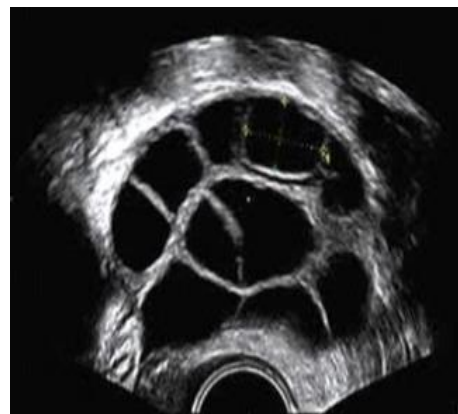


Figura 3: Imagen ecográfica de un ovario de vaca superovulado donde podemos observar múltiples folículos (Fuentes, 2015, p.90).

Una vez que se consigue que la hembra ovule muchos ovocitos es necesario su fecundación, para ello hay que proceder a la detección del celo. Se debe intensificar la vigilancia, incrementado la frecuencia y la duración de los periodos de observación, siendo recomendable, de tres a cuatro veces al día (mañana, mediodía y tarde) durante al menos 30 minutos como mínimo por vez (Guastavino, 2007). De considerarse necesario, es posible ayudarse con dispositivos que faciliten la detección del celo (pintura en la base de la cola, parche detector de monta, detectores de actividad motora, entre otros). Sin embargo, en caso de haberse incorporado un protocolo que controle la dinámica folicular y la ovulación no será necesaria la peripeca en la observación de los celos, lo cual representa un gran avance en la aplicación de la TE en condiciones de campo (Fuentes, 2015).

En la TE, la vaca donante es fecundada por IA ya que los niveles de calidad y precisión requeridos difícilmente se pueden conseguir con monta natural (Gosalvez y Vidal, 2006). Dado que las ovulaciones ocurren de forma asincrónica en 6-12 horas, se recomienda una doble o triple IA (Faizah *et al.*, 2018). La primera inseminación se realiza 6 horas después del inicio del estro, efectuando la segunda a una distancia de 10-12 horas de la primera, así nos aseguramos de cubrir el periodo de tiempo durante el cual pueden ocurrir las ovulaciones (Mikkola, 2017; Monaco, 2020). La dosis inseminadora normal está calibrada para una sola ovulación. Dado que muchos folículos maduran en rápida sucesión con la superovulación, la cantidad de espermatozoides disponibles debe aumentarse y distribuirse durante un período de tiempo más prolongado. Monaco (2020), recomienda utilizar el doble de dosis en cada inseminación, especialmente en vacas con un útero grande y colgante. Es esencial realizar las inseminaciones con semen de buena calidad, a fin de asegurar altos porcentajes de fecundación (Stringfellow, 2004). El semen se deposita en los cuernos uterinos por vía transcervical (Gosalvez y Vidal, 2006).

4. RECOGIDA, EVALUACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES

En primer lugar, resulta de vital importancia conocer la morfología de un embrión bovino. Es compacto y esférico y está compuesto por blastómeros de igual tamaño rodeados por una matriz translúcida, glicoproteica y acelular llamada zona pelúcida (ZP) (Monaco, 2020). La ZP es uniforme, no debe presentar ningún tipo de deformación ni rotura y tampoco restos celulares ni de ninguna otra índole sobre su superficie (Bó y Mapletoft, 2013). Realiza una serie de funciones relacionadas con importantes eventos que implican la formación del ovocito y diferentes etapas durante la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Así, interviene en la foliculogénesis, la organización y diferenciación de las células de la granulosa, el

reconocimiento y unión del espermatozoide, la inducción de la reacción acrosómica, el bloqueo a la polispermia y la protección del embrión preimplantado (Moros, 2015). El diámetro del embrión oscila entre 150 y 190 μm incluyendo el espesor de la ZP de 12 a 15 μm (Bó y Mapletoft, 2013; Monaco, 2020).

Como se ha mencionado previamente, años atrás, tanto la recuperación de embriones como la posterior transferencia a la hembra receptora se realizaba de forma quirúrgica, haciendo inviable la aplicación de esta técnica de forma rutinaria. Hoy en día, todas las recolecciones comerciales de embriones de vacuno son procedimientos no quirúrgicos que requieren el cateterismo transcervical de los cuernos uterinos (Ponce, 2015). Por su lado, la recogida no quirúrgica ofrece grandes ventajas al tratarse de un método barato, sencillo y muy asequible a nivel de campo, sin embargo, su principal inconveniente es que da lugar a un 10% menos de embriones recuperados (Fernández, 2014).

Los embriones bovinos descienden al útero el día 4 después del inicio del estro (considerado como día 0) y pierden la zona pelúcida entre el 8 y el 10 (Monaco, 2020). El momento idóneo para su recuperación es el día 6-8 después del comienzo del estro (Monaco, 2020; Mebratu *et al.*, 2020). La recogida temprana, a los 4-6 días, da lugar a bajas tasas de recuperación. Si por el contrario, la recogida se realiza de forma tardía, es decir, entre los días 9-14 se va a producir la eclosión lo que va a dificultar su identificación y aislamiento, al mismo tiempo que serán más susceptibles a la infección (Mebratu *et al.*, 2020). Además, los procedimientos de criopreservación y bisección se han optimizado para los embriones de los días 6-7, otra razón para elegir este momento (Mebratu *et al.*, 2020).

En lo que respecta al **procedimiento** a seguir para la recogida de los embriones (Universidad de Concepción, 2019; Monaco, 2020):

1. Se prepara el material. Se va a emplear una sonda Foley de 2 o 3 vías con balón inflable y un estilete de acero inoxidable estéril insertado a lo largo de toda la longitud de la sonda para hacerla lo suficientemente rígida y permitir su introducción en el útero mediante manipulación transrectal. En caso de ser necesario, se puede utilizar un dilatador y unas pinzas cervicales para ensanchar y tirar del canal cervical.
Es fundamental llevar un control de cada solución y del equipo que va a entrar en contacto con los embriones, por ello se recomienda el uso de productos comerciales.
2. Para tener una idea aproximada de la respuesta a la superovulación de la donante y poder estimar el número de embriones a recoger, se suele realizar una exploración rectal y/o ecografía transrectal.

3. Se efectua una anestesia epidural baja con 4-6 mL de lidocaína al 2% para prevenir la defecación y los empujes rectales.
4. Se efectua una limpieza y desinfección de la zona perianal y vulvar.
5. Colecta. El calibre de la sonda Foley dependerá de la talla y edad de la donante: 14 French (Fr) para novillas, 16 Fr para vacas y 18 o 20 Fr para vacas de gran tamaño (Universidad de Concepción, 2019). Se accede por vía transcervical con la sonda Foley (*Figura 4*) que se ancla, inflando el balón, al cuerpo uterino o a la mitad de cada uno de los cuernos en caso de lavarlos por separado. Cuando el catéter está en su lugar, se retira el estilete.
6. Se conecta la sonda a un tubo en Y con conexión Foley, por el cual se introducirá el medio de lavado. La porción restante de la unión en Y está unida a una tubería que conecta con un filtro (Monaco, 2020). Los embriones al ser más grandes que los poros (160 μm) permanecen en el filtro con una cantidad modesta de líquido para evitar su desecación.
7. Se procede al lavado de la luz uterina con un medio específico, buffer fosfato salino (PBS). Se trata de una solución acuosa y salina tamponada a la que se incorpora glucosa y piruvato como fuentes de energía para el crecimiento embrionario y la estabilización de la membrana (Monaco, 2020). A medida que se va introduciendo la solución, se realiza un ligero masaje de los cuernos uterinos para que aquellos embriones que se encuentren en los pliegues sean arrastrados por el medio hacia el exterior (Universidad de Concepción, 2019).

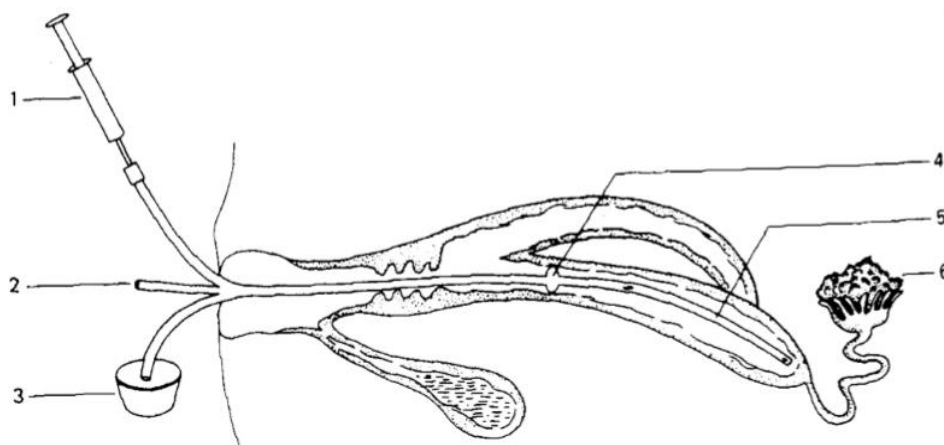


Figura 4: Sonda Foley empleada para el lavado de la luz uterina y recogida de los embriones. 1. Jeringa sin silicona 2. Tubo con balón dilatante; 3. Recolector; 4. Balón dilatante; 5. Catéter; 6. Ovario superovulado (Monaco, 2020, p.7).

Una vez obtenidos los embriones se debe proceder a realizar su evaluación y clasificación según las especificaciones del Manual de la IETS para su transferencia en fresco o criopreservación (Naranjo, 2019). La determinación de su calidad permite caracterizar, en términos cuantitativos, su posibilidad de desarrollo y nacimiento (Fernández, 2014). Para ello, se realiza una evaluación de las características morfológicas con un microscopio estereoscópico con el embrión colocado en un recipiente pequeño (Bó y Mapletoft, 2013).

Los criterios más importantes a tener en cuenta a la hora de evaluar y clasificar los embriones son: la forma, el tamaño, el color, el estadio de desarrollo esperado y la ZP (Monaco, 2020). Pero sin duda, el mejor indicador de la viabilidad de un embrión, es su estadio de desarrollo en relación al día en el que se encuentra después de la fecundación (*Tabla 1*) (Bó y Mapletoft, 2013; Universidad de Concepción, 2019).










<i>Secuencia de desarrollo</i>	<i>Horas desde el inicio del estro</i>	<i>Días desde el inicio del estro</i>	<i>Imagen</i>
Estro	0	0	
Ovulación	30-32	1	
Fecundación	33		
2 células	46-56	2	
4 células	50-66	3	
8 células	60-90	4	
16-32 células	90-125	5	
Mórula (30-64 células)	120-145	6	
Blastocisto joven	140-175	7	
Blastocisto expandido	170-210	8-9	
Blastocisto eclosionado		10	

Tabla 1: Estadios de desarrollo embrionario. Las mayores tasas de gestación se obtienen con mórulas compactas y blastocistos jóvenes, es decir, cuando han transcurrido 6-7 días después del estro (sombreado) (Elaboración propia).

El código de la etapa de desarrollo es numérico, en un rango de 1 al 9 (1: ovocito sin fertilizar o embrión de 1 célula; 2: embrión de 2 a 12 células; 3: mórula temprana; 4: mórula; 5: blastocisto temprano; 6: blastocisto; 7: blastocisto expandido; 8: blastocisto eclosionado; 9: blastocisto expandido-eclosionado). Por otro lado, se encuentra el código de calidad del embrión, también numérico y basado en su integridad morfológica. El código de calidad oscila entre 1 y 4 (Fernández, 2014):

- **Código 1: Excelente o bueno** (Figura 5). Masa embrionaria simétrica y esférica. Los blastómeros son uniformes en tamaño, color y densidad. El embrión concuerda con el estadio de desarrollo esperado. Las irregularidades deben ser mínimas, y al menos 85% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable (este criterio debe basarse en el porcentaje de células embrionarias representadas por el material extruído en el espacio perivitelino). La zona pelúcida debe ser lisa, sin superficies cóncavas o planas, ni irregularidades (Fernández, 2014; Monaco, 2020). Sobreviven bien al procedimiento de congelación/descongelación. Por lo general, a menos que se acuerde lo contrario, solo los embriones del Código 1 deben utilizarse en el comercio internacional (Bó y Mapletoft, 2013).

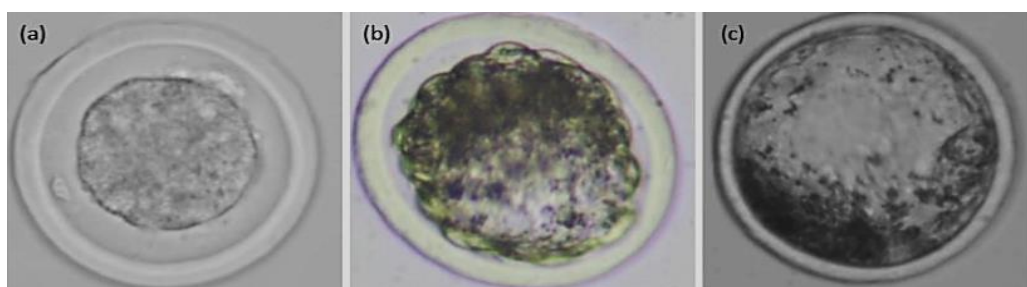


Figura 5: Embriones con código de calidad 1. (a) En etapa de desarrollo 4: mórula; (b) En etapa de desarrollo 5: blastocisto temprano; (c) En etapa de desarrollo 6: blastocisto (Universidad de Concepción, 2019, p.34).

- o **Código 2: Aceptable** (Figura 6). Irregularidades moderadas en la forma total de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable (Fernández, 2014; Monaco, 2020). Deben transferirse frescos a recipientes adecuados (Bó y Mapletoft, 2013).

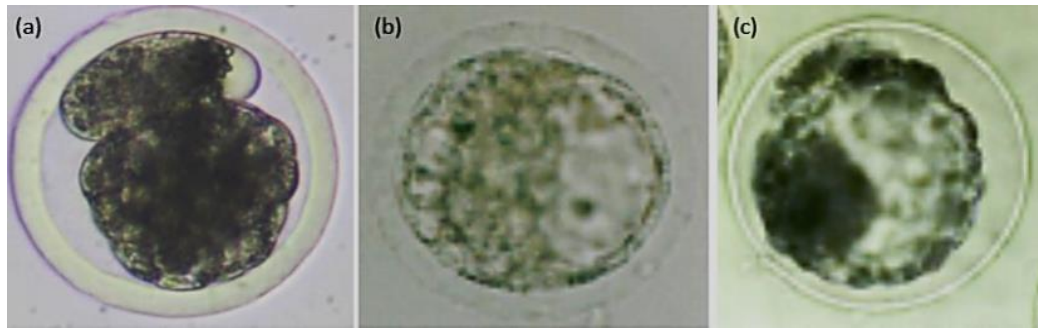


Figura 6: Embriones con código de calidad 2. (a) En etapa de desarrollo 4: mórula; (b) En etapa de desarrollo 5: blastocisto temprano; (c) En etapa de desarrollo 7: blastocisto expandido (Universidad de Concepción, 2019, p.35).

- **Código 3: Malo** (*Figura 7*). Irregularidades importantes en la forma total de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable (Fernández, 2014; Monaco, 2020).

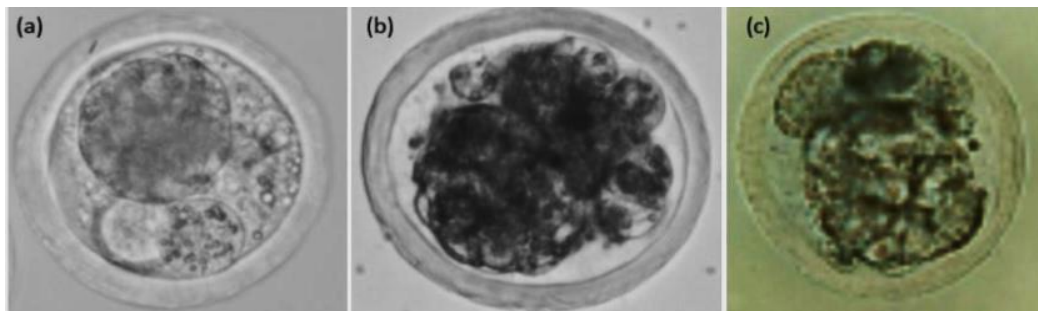


Figura 7: Embriones con código de calidad 3. (a), (b) y (c) En etapa de desarrollo 4: mórula (Universidad de Concepción, 2019, p.35).

- **Código 4: Muerto o deteriorado** (*Figura 5*). Ovocitos sin fecundar, embriones en etapas de segmentación previas a la de mórula, embriones muertos o degenerados. No son viables, se descartan (Fernández, 2014; Monaco, 2020).

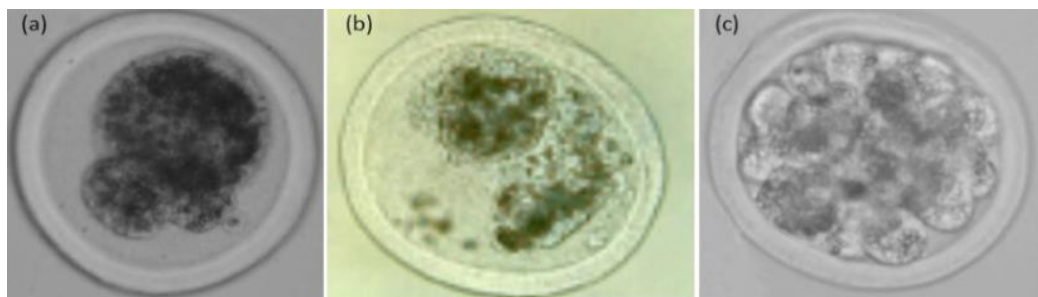


Figura 8: Embriones con código de calidad 4. (a) En etapa de desarrollo 1: sin fertilizar; (b) En etapa de desarrollo 1: sin fertilizar y degenerado (c) En etapa de desarrollo 2: embrión de 2 a 12 células degenerado (Universidad de Concepción, 2019, p.36).

Los embriones de excelente y buena calidad, en las etapas de desarrollo de mórula compacta a blastocisto, producen las tasas de preñez más altas (Bó y Mapletoft, 2013; Universidad de Concepción, 2019).

Por lo tanto, la decisión sobre si un embrión es digno de ser transferido, congelado o si es elegible para la exportación dependerá de los conocimientos y la experiencia de la persona que los evalúa. El Manual de IETS, aclara que la evaluación visual de los embriones es una valoración subjetiva de un sistema biológico y, en consecuencia, no es una ciencia exacta. Esto implica que las tasas de gestación pueden ser más bajas de lo esperado, debido también a otros factores como las condiciones ambientales, la calidad de la receptora y la habilidad del técnico encargado de la manipulación (Bó y Mapletoft, 2013).

5. SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS

Las hembras donantes superovuladas proporcionan de media entre 6 y 7 embriones transferibles. Esto implica que hay que preparar al menos a siete hembras receptoras. En consecuencia, hay que palpar a un número suficiente hasta identificar siete con CL activos. Si existen dudas, debe confirmarse la presencia de CL mediante ecografía (Monaco, 2020).

El objetivo es maximizar la supervivencia del embrión, para ello resulta necesario que el ambiente uterino de la receptora sea muy similar al de la donante (Fuentes, 2015). Si la disponibilidad de estas es muy alta, es probable que los animales en celo en un día determinado sean suficientes para los embriones producidos en ese momento. Esto no es lo más frecuente. Por ello, es necesario controlar la etapa del ciclo estral para lograr una sincronía aceptable entre donantes y receptoras (Lamb, Fontes, y Oosthuizen, 2019). El desarrollo de protocolos de sincronización de celos ha permitido que se establezca esta sincronía, reduciéndose la cantidad de receptoras requeridas y facilitando la incorporación de la TE en las explotaciones de ganado (Lamb, Fontes, y Oosthuizen, 2019). El éxito de este tipo de programas depende de la coordinación de tres áreas generales: la fisiología del ciclo estral, la aplicación de agentes farmacológicos y el manejo del rebaño (Mapletoft y Bó, 2016). La sincronización implica en primer lugar que las hembras sean cíclicas y, en segundo lugar, que sólo un 70% responderá al tratamiento (Alberio, 2004). Idealmente, las tasas de gestación serán altas siempre que el inicio del estro en la receptora se produzca dentro de las 24 horas posteriores al sincronismo con la donante (Mapletoft y Bó, 2016; Getachew, Lemma y Fesseha, 2020).

En este sentido, los ciclos de estro se pueden sincronizar con prostaglandinas y sus análogos, o con dispositivos intravaginales de liberación lenta de progesterona (Faizah *et al.*, 2018; Monaco,

2020). La selección del protocolo más apropiado debe realizarse en base a las capacidades de manejo y el grado de sincronización deseado (Islam, 2011).

Las prostaglandinas se han convertido en el tratamiento más antiguo para la sincronización del estro en el ganado (Butler *et al.*, 2011; Graaff y Grimard, 2018). Sin embargo, solo resultan eficaces si se administran entre los días 8 y 17 del ciclo estral, cuando existe un cuerpo lúteo funcional en uno de los ovarios (Islam, 2011). Las receptoras sincronizadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ deben ser tratadas 12-24 horas antes que la donante. Esto es porque el estro inducido por $\text{PGF}_{2\alpha}$ ocurrirá en las receptoras 60-72 horas después de la inyección y en las donantes superovuladas en 36-48 horas (Mapletoft y Bó, 2016, Hernandez, 2019). En éstas últimas, la presentación del celo es más temprana y la ovulación se puede extender durante un período que puede superar las 12 h (Alberio, 2004). En un estudio realizado para evaluar la tasa de preñez en las receptoras con estro natural o inducido por $\text{PGF}_{2\alpha}$, se observó que estas fueron más altas en las receptoras sincronizadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ probablemente debido a una mejor detección del celo (Mapletoft y Bó, 2016). Es importante tener en cuenta que las $\text{PGF}_{2\alpha}$ solo regulan la duración de la actividad del CL, por lo tanto, cuando la luteólisis es eficazmente inducida, el estro resultante se distribuye durante un período de 7 días y es necesario detectarlo (Giraldo, 2008). También, se puede optar por un protocolo de doble $\text{PGF}_{2\alpha}$ con un intervalo de 10-11 días entre tratamientos (Islam, 2011). En relación con este hecho, se ha informado que alargar el intervalo hasta 14 días aumenta la tasa de concepción, probablemente porque hay más posibilidades de que haya un folículo dominante en crecimiento. Teóricamente, todos los animales deberían tener un CL sensible a las prostaglandinas en el momento del segundo tratamiento (Mapletoft y Bó, 2016).

Otro posible tratamiento que ha tenido un gran éxito para la sincronización del estro son los progestágenos, en especial, los dispositivos intravaginales liberadores de progesterona (Stroud y Hasler, 2006). La progesterona altera la función de los ovarios al suprimir el estro y prevenir la ovulación. También, anula el crecimiento de los folículos dependientes de LH al suprimir, a su vez, la frecuencia de pulsos de esta hormona. Sin embargo, las ondas foliculares continúan emergiendo en presencia de CL funcional puesto que la secreción de FSH no se ve interrumpida (Mapletoft y Bó, 2016). En general, la progesterona administrada durante más tiempo que el ciclo de vida del CL da como resultado una mayor tasa de sincronización, pero la fertilidad es baja en los animales sincronizados (Islam, 2011; Mapletoft y Bó, 2016).

6. CONSERVACIÓN DE EMBRIONES

La conservación de los embriones recuperados constituye una etapa esencial dentro de la técnica. Existen cuatro posibles métodos (temperatura ambiente, refrigeración, congelación o vitrificación), los cuales se presentan a continuación:

Si los embriones van a ser transferidos el mismo día de la recolección, se pueden conservar en solución PBS recién preparada y estéril donde podrán permanecer viables a **temperatura ambiente** durante varias horas (nunca superar las 12 horas) (Fernandez, 2014). Para un periodo de tiempo más prolongado, es necesario recurrir a temperaturas de **refrigeración** entre 0 y 4°C, sin embargo, las soluciones de almacenamiento utilizadas hasta el momento solo mantenían la viabilidad del embrión durante 24-48 h (Cabrera y Fernández, 2006; Ideta *et al.*, 2015). En este sentido, investigaciones recientes han demostrado que los embriones pueden mantenerse, sin que pierdan la viabilidad, durante 10 días a 4°C mediante el precalentamiento controlado a 37°C en un medio que contiene 10 mg/ml de proteína anticongelante aislada de *Zoarcetes elongatus* (Ideta *et al.*, 2015; Mikkola, 2017), siendo posible así realizar análisis genómicos previos a la conservación (Mikkola, 2017). Es importante tener en cuenta que con ambos métodos, cuanto más tiempo transcurra desde la recolección va a influir de forma negativa en la tasa de gestación, que se verá disminuida progresivamente.

Si, por el contrario, se quiere almacenar los embriones a largo plazo, es esencial recurrir a temperaturas de congelación para conservarlos. La **criopreservación o congelación** es el proceso mediante el cual las células o tejidos se conservan a bajas temperaturas, generalmente entre -80 y -196°C, paralizando su actividad metabólica (Córdova *et al.*, 2015). Durante el proceso de congelación de embriones, se deben seguir los principios de la criobiología. Los movimientos y los cambios de fase del agua intracelular, así como la velocidad de enfriamiento, juegan un papel importante en la supervivencia del embrión. En la congelación rápida, la célula se encuentra poco deshidratada y el agua intracelular forma grandes cristales que originan lesiones irreversibles en las membranas y estructuras intracelulares (Espinosa, 2017). Por el contrario, si la congelación se realiza lentamente, la célula tiene tendencia a deshidratarse, lo que limita la formación de cristales y favorece una buena supervivencia post-criopreservación (Espinosa, 2017). Hay que tener especial cuidado con la prolongación excesiva de la congelación lenta, pues si la célula se deshidrata demasiado, se va a producir un gran incremento intracelular de la concentración de electrolitos y muere (Espinosa, 2017). La mejor opción es una congelación lenta a velocidad de 0,3-1°C/min hasta los -34°C, temperatura a la que permanecen durante 10 minutos. Seguidamente, se sumergen de forma rápida en nitrógeno

líquido a -196°C (Youngs, Leibo y Godke, 2010). De este modo, se consigue la formación de un escaso número de pequeños cristales, compatible con la supervivencia celular.

También, para prevenir que durante la congelación se formen cristales se utilizan compuestos crioprotectores, es decir, sustancias que protegen a la célula cuando es sometida a bajas temperaturas. Por ello, resultan necesarios en las soluciones de congelación para evitar el daño celular. Estos, se dividen en dos categorías: penetrantes (glicerol, etilenglicol, propilenglicol) y no penetrantes (sacarosa, albúmina, dextranos, ácido hialurónico, polivinilpirrolidona) (Córdova *et al.*, 2015). Los no penetrantes son impermeables al embrión, se trata de compuestos de alto peso molecular, generalmente azúcares y proteínas, que mantienen una alta presión osmótica en el medio extracelular durante la remoción del crioprotector lo que previene el shock osmótico (Córdova *et al.*, 2015). En este sentido, resulta de vital importancia hacer una buena selección del crioprotector pues de lo contrario puede producirse un efecto nocivo para el embrión.

Durante muchos años, el glicerol ha sido el crioprotector más utilizado. Sin embargo, su lenta capacidad de penetración celular sumado a que tiene que ser eliminado paulatinamente tras la descongelación, ha provocado que con el tiempo se haya visto reemplazado por otros crioprotectores con mayor penetración, como por ejemplo, el etilenglicol. Este crioprotector permite descongelar a los embriones y transferirlos directamente a la receptora gracias a su capacidad para abandonar de forma sencilla las células embrionarias en el interior del útero sin provocar estrés osmótico (García *et al.*, 2017). Ese hecho, ha favorecido la realización de la TE en condiciones de campo

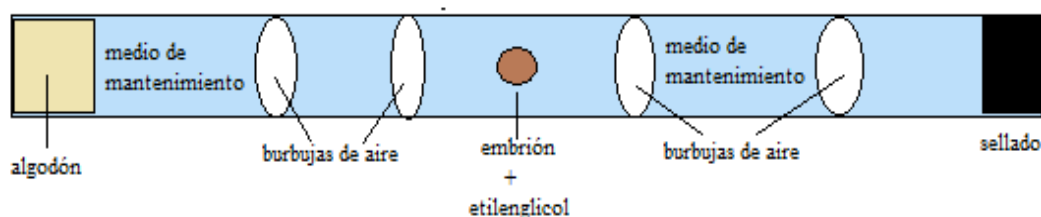


Figura 9: Representación esquemática de una pajuela con un embrión conservado en congelación para su posterior transferencia a una receptora. El llenado se realiza con la aspiración de un pequeño volumen de medio de mantenimiento, seguido de la aspiración de una burbuja de aire, repitiéndose este mismo proceso antes de aspirar al embrión. Se aspira al embrión. Se repite el primer paso (medio de mantenimiento- aire-medio de mantenimiento-aire). Sellado de la pajuela (Elaboración propia).

Sin embargo, el método de congelación/descongelación es un proceso que requiere emplear bastante tiempo y además, obliga a la utilización de congeladores biológicos. Por ello, se ha desarrollado una técnica mucho más sencilla: la **vitrificación**. Esta tecnología consiste en deshidratar al embrión a temperatura ambiente a través de un medio muy concentrado con distintas mezclas de crioprotectores, seguido de un enfriamiento ultrarrápido para lograr que aumente la viscosidad de la solución hasta asemejarse al vidrio (estado “vítreo”). Con esta

técnica se evita la formación de cristales de hielo intracelulares (Fernández, 2014). Las soluciones de vitrificación mantienen la distribución iónica y molecular de un líquido pero en un estado sobreenfriado y extremadamente viscoso (Córdova *et al.*, 2015), gracias a ello, toman la forma de las células y permiten mantener intacta su estructura (García *et al.*, 2017). La probabilidad de que una solución vitrifique aumenta a medida que el volumen se reduce, lo que ha conducido a desarrollar diversos soportes en los que depositar los embriones durante el proceso (Arav, 2014; García *et al.*, 2017). La vitrificación es una técnica sencilla, de fácil ejecución, costo-eficiente y con tasas de gestación aceptables, por lo que se ha convertido en una tecnología muy interesante, capaz de reemplazar a la congelación convencional, especialmente cuando se intentan conservar embriones sensibles a la criopreservación como los producidos *in vitro* (Zárate-Guevara, 2018).

Con todo, las tasas de gestación obtenidas con embriones criopreservados son del 56,1%, ligeramente inferiores a las obtenidas al transferir embriones frescos (68,3%) (Faizah *et al.*, 2018). Por ello, se están investigando alternativas que permitan incrementar las tasas de gestación de embriones criopreservados. Una técnica novedosa que parece solucionar este problema es la **blastocentesis**. El día 7, el embrión bovino (blastocisto), tiene una cavidad central llena de fluido llamada blastocele. Esta técnica consiste en reducir de manera artificial el volumen de esta cavidad mediante micromanipuladores, microagujas, micropipeta y un microscopio invertido. Al tratarse de un procedimiento muy novedoso, no hay información de su utilización en embriones bovinos previo a su criopreservación (Zárate-Guevara, 2018).

7. TRANSFERENCIA DE LOS EMBRIONES A LA HEMBRA RECEPTORA

En lo que respecta a la técnica de transferencia, los embriones son transferidos directamente a través del cuello uterino de manera similar a la IA (Monaco, 2020):

1. En primer lugar, se extraen las heces del recto y se explora para determinar en qué ovario se encuentra el CL.
2. Es aconsejable realizar anestesia epidural para prevenir que el animal empuje y defaque.
3. Se lava y desinfecta la zona perianal y vulvar. Es muy importante reducir la contaminación del útero ya que durante la fase luteínica es mucho más susceptible a las infecciones.

4. Se coloca la pajuela en una pistola de transferencia y se corta por un extremo para que pueda salir el embrión. La colocación de una funda sanitaria en la pistola es de vital importancia.
5. Se deposita el embrión en el tercio anterior del cuerno uterino ipsilateral al CL (*Figura 10*).

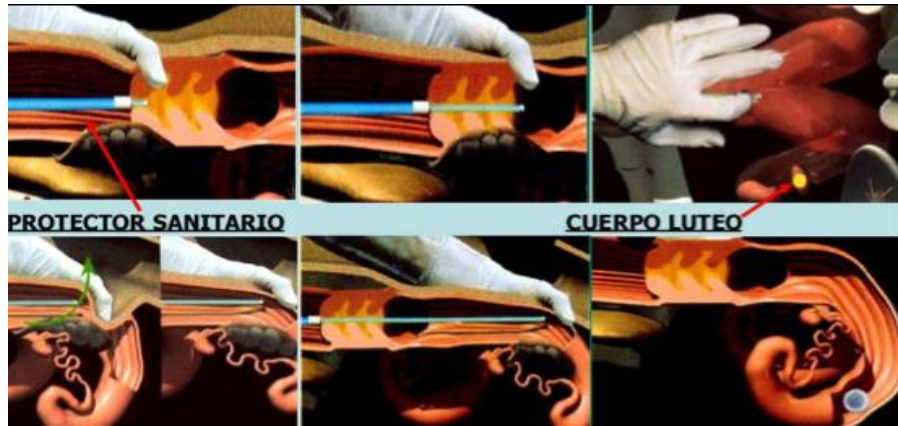


Figura 10: Transferecia del embrión a la hembra receptora. Se realiza la deposición del mismo en el cuerno uterino ipsilateral al CL (Fuentes, 2015, p.121).

Se ha demostrado una correlación negativa entre el tiempo empleado a manipular el cuello y los cuernos uterinos y las tasas de gestación. Además, si se traumatiza el endometrio, se producirán hemorragias y la sangre resulta tóxica para el embrión. Inicialmente, el fracaso suele estar determinado por la falta de habilidad, mejorando las tasas de preñez con la experiencia (Monaco, 2020).

En cualquier caso, la identificación temprana de las receptoras no gestantes permite su reutilización de forma eficiente y económica. De las vacas diagnosticadas gestantes por ecografía el día 28, el 13,5% va a experimentar reabsorción embrionaria temprana (Monaco, 2020). Por ello, deben ser reexaminadas 60 días después. Este momento también es excelente para el sexaje fetal (entre el día 55 y el 70).

Cada receptora podrá tener tres oportunidades "buenas" para quedar gestante, puesto que las tasas de gestación en la primera y segunda transferencia son similares, comenzado a disminuir a partir de la tercera (Alberio, 2004). Luego de esto, la caída es alta y no justifica el mantenimiento de esta hembra (Alberio, 2004). La tasa de abortos en las receptoras utilizadas para TE suele ser ligeramente superior a la de vacas que han quedado gestantes de forma "natural" (Alberio, 2004).

Conclusiones

Tras la exposición de los argumentos que se han llevado a cabo a lo largo del presente trabajo, se puede concluir que:

- El origen de la TE tuvo lugar hace más de 100 años, desde entonces ha experimentado una gran evolución técnica hasta su uso a nivel comercial. El método no quirúrgico por vía vaginal ha supuesto una contribución vital al ser mucho más rápido, sencillo y económico.
- El éxito comercial de la TE se debe a su capacidad para superar el limitado progreso genético de la especie bovina obteniéndose un elevado número de descendientes a partir de hembras con un mayor potencial genético.
- Para inducir la ovulación múltiple, se utilizan hormonas gonadotropas exógenas estimulantes del folículo. La respuesta ovárica óptima se produce cuando el inicio del tratamiento coincide con la emergencia de la oleada de crecimiento folicular. Sin embargo, la superovulación sigue siendo el paso menos predecible en el proceso de transferencia de embriones, la variabilidad individual en la respuesta a los protocolos de superovulación, es el factor limitante más importante que afecta a los resultados.
- Un método prometedor que permite predecir la respuesta al tratamiento de superovulación es la determinación sérica de hormona anti-Mülleriana producida en la granulosa de los folículos antrales sanos.
- Resulta necesario que el ambiente uterino de la hembra receptora sea muy similar al de la donante, por ello se realiza la sincronización del estro.
- El momento idóneo para la recuperación de los embriones es 6-8 días después del comienzo del estro. Los criterios más importantes a tener en cuenta a la hora de evaluarlos y clasificarlos son sus características morfológicas. Las tasas de preñez más altas se producen con embriones de excelente y buena calidad en las etapas de desarrollo de mórula compacta a blastocisto.
- Las tasas de gestación obtenidas con embriones criopreservados son inferiores a las obtenidas con los embriones frescos, sin embargo, son lo suficientemente aceptables como para considerar la congelación de embriones una técnica fundamental en la TE.
- La congelación poco a poco se está viendo sustituida por la vitrificación al ser una técnica mucho más sencilla y efectiva que permite obtener elevadas tasas de supervivencia embrionaria.

Bibliografía

- Alberio, R. H. (2004). Manejo de donantes y receptoras. Disponible en: http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_02.pdf [Consultado 16-12-2020]
- AETE (2020). *Commercial Embryo Transfer Activity in Europe 2019*. Disponible en: <https://www.aete.eu/publications/statistics/> [Consultado 3-12-2020]
- Alvear, E. (2010). Caracterización productiva y reproductiva de la hacienda San Jorge para Recomendar un Programa de Inseminación Artificial. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Arav, A. (2014). “Cryopreservation of oocytes and embryos”, *Theriogenology*, 81 (1):96–102.
- Betteridge, K. J. (2003). “A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques”, *Animal Reproduction Science*, 79:203-244.
- Bó, G. A., Hockley, D. K., Nasser, L. F. y Mapletoft, R. J. (1994). “Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle”. *Theriogenology*, 42:963-975.
- Bó, G. A., Adams, G.P., Caccia M., Martinez, M., Pierson, R. A. y Mapletoft, R. J. (1995). “Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle”, *Animal Reproduction Science*, 39:193-204.
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia L., Caccia, M., Tribulo, R., Tribulo, H. y Mapletoft, R. J. (2002). “The control of follicular wave development for selfappointed embryo transfer programs in cattle”. *Theriogenology*, 57(1):53-72.
- Brito, B. J. (2012). *Manejo de receptoras en programas de transferencia de embriones a tiempo fijo*. Monografía de grado. Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Butler, S. A., Phillips, N. J., Boe-Hansen, G. B., Bó, G. A., Burns, B. M., Dawson, K. y McGowan, M. R. (2011). “Ovarian responses in *Bos indicus* heifers treated to synchronise ovulation with intravaginal progesterone releasing devices, oestradiol benzoate, prostaglandin F(2 α) and equine chorionic gonadotrophin”, *Animal Reproduction Science*, 129(3-4):118-126.
- Cabrera, P. y Fernández, A. (2006). “Criopreservación de Embriones: una herramienta básica de la Reproducción Asistida”, *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 47(2):59-70.
- Carballo, D., Tríbulo, A., Tríbulo, R., Tríbulo, H. y Bó, G. A. (2010). “Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four d after progesterone and estradiol administratio”, *Reproduction, Fertility and Development*, 22:358

- Carballo, D. (2012). *Superovulación en la primera onda folicular*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Choudhary, K., Kavya, K., Jerome, A. y Sharma, R. (2016). "Advances in reproductive biotechnologies", *Veterinary World*, 9(4):388-395.
- Colazo, M., y Mapletoft, R., (2007). "Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos", *Ciencia Veterinaria*, 9(1):20-37.
- Córdova, A., Guerra, J. E., Villa, A., Olivares, J., Cansino, G., Juárez-Mosaqueda, L. y Pérez, J. F. (2015). "Congelación de embriones bovinos", *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9(2):22-40.
- *Directiva 89/556/CEE* del Consejo, de 25 de septiembre de 1989, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones procedentes de terceros países de embriones de animales domésticos de la especie bovina.
- D'Occhio, M. J., Sudha, G., Jillella, D., Write, T., MacLellan, L. J., Walsh, J., Trigg, T. E. y Miller, D. (1997). "Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation", *Theriogenology*, 47:601-613.
- Escobar, C. J. (2018). "Embryo transfer, a potential risk in disease transmission", *MOT Anatomy & Physiology*, 5(4):259-262
- Espinosa, E. (2017). "Biotecnologías embrionarias aplicadas a la reproducción en la hembra", *Anales de la Real Academia de Doctores de España*, 2:144-163.
- Elsdén, R. P., Nelson, L. D. y Seidel, G. E. (1978). "Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin", *Theriogenology*, 9(1): 17-26.
- Faizah, H. M. S., Richard, F., Meena, P., Stanley, K. L., Amriana, H., Alhassany, A., Yadav, S. B., Mariel, L., Crouch, B., Son y Saipul, B. A. R. (2018). "Multiple ovulation embryo transfer (MOET) in dairy cattle in gattón", *Malaysian Journal of Veterinary Research*, 9(2):109-116
- FAO (2010). "Métodos de mejora genética en apoyo de una utilización sostenible", *Estado de la cuestión en la gestión de los recursos zoológicos*, 4:417-467. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s18.pdf> [Consultado 07-01-2021]
- Fernandez, E. (2014). *Producción de embriones in vivo en tres razas de ganado lechero*. Tesis para optar al título ingeniero zootecnista. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.
- Fuentes, S. (2015). *Incremento del porcentaje de gestación en la transferencia de embriones bovinos de aptitud láctea mediante tratamientos hormonales de*

- sincronización y postransferencia de la hembra receptora*. Tesis doctoral. Universidad de León, España.
- García, A., Tribulo, A., Yapura, J., Adams, G. P., Singh, J. y Mapletoft, R. J. (2015). “Lengthened superstimulatory treatment in cattle: Evidence for rescue of follicles within a wave rather than continuous recruitment of new follicles”, *Theriogenology*, 84:467-476
 - García, P., Quintela, L., Becerra, J. y Peña, A. (2017). La transferencia de embriones en bovinos se utiliza desde hace más de 40 años. Departamento de Patología Animal, Universidad de Santiago de Compostela, España.
 - Getachew. Y., Lemma. A. y Fesseha, H. (2020). “Assessment on reproductive performance of crossbred dairy cows selected as recipient for embryo transfer in urban set up bishoftu, Central Ethiopia”, *Internacional Journal of Veterinary Science and Research*, 6(1):80-86.
 - Giraldo, J. J. (2008). “Sincronización y resincronización de celos y ovulaciones en ganado de leche y carne”, *Revista Lasallista de Investigación*, 5(2):90-99.
 - González, O., Jiménez-Montero, J. A., Alenda, R. (2010). “La selección genómica aplicada a un programa de mejora en vacuno de leche”, *Revista Frisona Española*, 177: 104-107.
 - Gosalvez, L. F. y Vidal, A. (2006). La transferencia embrionaria en el ganado vacuno. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).
 - Graaff, W. y Grimard, B. (2018). “Progesterone-releasing devices for cattle estrus induction and synchronization: Device optimization to anticipate shorter treatment durations and new device developments”, *Theriogenology*, 112:34-43
 - Guastavino, E. (2007). Herramientas de ayuda para la detección del celo. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/96-herramientas_deteccion_celos.pdf [Consultado 07-01-2021]
 - Seidel, G. y Moore, S. (2005). “Training manual for embryo transfer in cattle”, *FAO animal production and health paper*, 77.
 - Hasler, J. F. (2014). “Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences”, *Theriogenology*, 81:152-169.
 - Heape, W. (1980). “Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother”, *Proceedings of the Royal Society of London*, 48:9-457
 - Hernandez, S. (2019). Embryo transfer protocols update at fixed time. Seminario de profundización en reproducción. Universidad Cooperativa de Colombia.

- Ideta, A., Aoyagi, Y., Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Hayama, K., Shirasawa, A., Sakaguchi, K., Tominaga, N., Nishimiya, Y. y Tsuda, S. (2015). “Prolonging hypothermic storage (4C) of bovine embryos with fish antifreeze protein”, *Journal Reproduction Development*, 61(1):1-6
- IETS Data Retrieval Report (2019). *2018 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals*. Disponible en: https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2018.pdf [Consultado 07-01-2021]
- IETS (2020). *About IETS*. Disponible en: <https://www.iets.org/about.asp> [Consultado 07-01-2021]
- Ireland, J. J., Smith, G. W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L., Mossa, F., Lonergan, P. y Evans, A. C. (2011). “Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic maker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle”, *Reproduction, fertility and development*, 23(1):1-14
- Islam, R. (2011). “Synchronization of estrus in cattle: a review”, *Veterinary World*, 4(3):136-141
- Kanagawa, H. (1988). Bovine embryo transfer. Japan International Cooperation Agency, pp.168
- Mapletoft, R. J. (2013). “History and perspectives on bovine embryo transfer”, *Animal Reproduction*, 10(3):168-173.
- Mapletoft, R. J. y Bó, G. A. (2013). “Evaluation and classification of bovine embryos”, *Animal Reproduction Science*, 10(3):344-348.
- Marja, M. (2017). *Superovulation and embryo transfer in dairy cattle - effect of management factors with emphasis on sex-sorted semen*. Academic Dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.
- Martínez, D. (2008). “Estudio económico de la transferencia embrionaria en las ganaderías gallegas”, *Revista Frisona Española*, 165:78-82.
- Mebratu, B., Fesseha, H. y Goa, E. (2020). “Embryo Transfer in Cattle Production and Its Principle and Applications”, *International Journal of Pharmacy & Biomedical Research*, 7(1):40-54.
- Merlo, B. (2007). *Possibilità di miglioramento delle tecniche di riproduzione assistita negli animali domestici*. Tesi di dottorato. Università di Bologna, Italia.

- Monaco, D. (2020). Applicazione di biotecnologie riproduttive in animali in allevamento intensivo. Scuola di Specializzazione in Fisiopatologia della Riproduzione degli Animali Domestici.
- Monniaux, D., Chupin, D. y Saumande, J. (1983). “Superovulatory responses of cattle”, *Theriogenology*, 19:55-81.
- Moros, C. (2015). *Análisis molecular, proteómico y filogenético de la zona pelúcida de mamíferos*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España.
- Naranjo, F. (2019). *Tasa de gestación de embriones bovinos criopreservados producidos mediante ovulación múltiple usando diferentes dosis de FSH y eCG*. Tesis doctoral. Universidad de Veracruzana.
- Lamb, G. C., Fontes, P. L. y Oosthuizen, N. (2019). In vitro fertilization (IVF) versus Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET): Making the decision to use one or both. Disponible en: <https://beefrepro.org/wp-content/uploads/2020/09/14-Lamb-C.pdf> [Consultado 19-01-2020]
- OIE (2011). Capítulo 4.8: Recolección y manipulación de embriones/ovocitos de ganado y caballos producidos *in vitro*. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2011/es_chapitre_1.4.8.htm [Consultado 3-12-2020]
- Palma, G. A. (2001). Biotecnología de la reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Ponce, N. (2015). *Transferencia de embriones en ganado bovino*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad CEU Cardenal Herrera, Alfara del Patriarca, Valencia.
- Real Academia Española (RAE). Diccionario de la lengua española, 23.^a ed., [versión 23.4 en línea]. Disponible en: <https://dle.rae.es> [Consultado 27-11-2020]
- *Real Decreto 855/1992*, de 10 de julio, por el que se fijan las condiciones de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones procedentes de terceros países de embriones de animales domésticos de la especie bovina.
- Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbiès-Tran, R., Jarrier, P., Touzé, J. L., Pillet, E., Ponsart, C., Fabre, S. y Monniaux, D. (2012). “Determination of anti-Mullerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm”, *Reproduction, Fertility, and Development*, 24(7):932–944.
- Selk, G. (2002). Embryo Transfer in Cattle. Oklahoma Cooperative Extension Service. Disponible en:

https://shareok.org/bitstream/handle/11244/49938/oksd_ansi_3158_2002-09.pdf?sequence=1&isAllowed=y [Consultado 27-12-2020]

- Siqueira, L. G., Dikmen, S., Ortega, M. S. y Hansen, P. J. (2017). "Postnatal phenotype of dairy cows is altered by in vitro embryo production using reverse X-sorted semen", *Journal of Dairy Science*, 100(7): 5899-5908.
- Stringfellow, D. A. (2004). Manipulación de los embriones recolectados para la transferencia comercial. *Manual de la IETS*. Disponible en: http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_16_iets.pdf [Consultado 07-01-2021]
- Tempelman, R. y Burnside, E. (2010). "Additive and dominance genetic variation for dairy production traits under an animal model", *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 108:330–342.
- Universidad de Concepción (2019). *Manual Práctico de Transferencia de Embriones*. Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chile.
- Uribe, C. (2018). *Evaluación del porcentaje de preñez por transferencia de embriones para los predios Centenario y Fundadores durante el periodo 2015 a 2017*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias de Caldas, Antioquia.
- Velazquez, M. A. (2011). "The role of nutritional supplementation on the outcome of superovulation in cattle", *Animal Reproduction Science*, 126:1-10.
- Willett, E. L., Black, W. G., Casida, L. E., Stone, W. H. y Buckner, P. G. (1951). "Successful transplantation of a fertilized bovine ovum", *Science*, 113:247.
- Youngs, C. R., Leibo, S. P. y Godke, R. A. (2010). "Embryo cryopreservation in domestic mammalian livestock species", *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources*, 5:1-11.
- Zanrosso, D. (2019). *Il rischio nascosto: trasmissione di microrganismi patogeni mediante Embryo Transfer bovino*. Trabajo de fin de Máster. Universidad de Parma, Italia.
- Zárate-Guevara, O., Cisneros-Prado, J., Canseco-Sedano, R., Montiel-Palacios, F. y García, A. (2018). "Transferencia de embriones bovinos criopreservados: Efecto de la blastocentesis", *Agrociencia*, 52:21-32.