

# Biotechnologías reproductivas: *in vivo* e *in vitro*; ayer y hoy

Iriart, M.I.<sup>(1)</sup>

## Resumen

La superovulación (SOV) de hembras de alto valor genético combinada con la inseminación artificial (IA) y la transferencia de embriones (TE) a hembras receptoras de bajo mérito genético se han convertido en el principal sistema de producción de embriones bovinos *in vivo* de elite en Argentina. Por otro lado, la generación de embriones mediante fecundación *in vitro* (FIV) de oocitos recuperados por aspiración folicular (OPU, del inglés *ovum pick-up*) provenientes de ovarios de vacas de interés comercial, combinado también con la TE, está creciendo considerablemente en el país. Dentro del grupo *in vitro*, donde los embriones son generados en condiciones de laboratorio, también es posible enumerar técnicas más sofisticadas como la clonación o transferencia nuclear (TN) y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI, del inglés *intracytoplasmic sperm injection*). La TN permite la generación de copias idénticas de un individuo que, junto con la transgénesis animal, tienen numerosas aplicaciones en las áreas de producción animal, industria farmacéutica y biomedicina. La ICSI, en cambio, actualmente se encuentra más restringida a la producción de embriones humanos en clínicas de fecundación asistida, aunque están creciendo notablemente los intentos con éxito en la especie equina.

Como biotechnologías reproductivas también es posible incluir técnicas casi olvidadas, como la producción de gemelos idénticos mediante la división de embriones (ya sea de manera quirúrgica o por desagregación de blastómeras) y la producción de quimeras.

Asimismo, la criopreservación de embriones ha jugado un papel fundamental en la implementación de las biotechnologías reproductivas. Los avances en las diferentes técnicas de criopreservación de los embriones producidos han permitido disponer mejor de las hembras donantes, independizándose de los tiempos biológicos y de los resultados de los protocolos de sincronización, como también han posibilitado transportar y comercializar genética de forma económica entre países de distintos continentes.

**Palabras clave:** inseminación artificial; fecundación *in vitro*; transferencia de embriones; clonación; criopreservación.

(1) Licenciada en Biotecnología de la Universidad Nacional de Quilmes y Doctora de la Universidad de Buenos Aires, en el área Ciencias Agropecuarias. Ex docente de la Facultad de Agronomía de la UBA (FAUBA). Directora General de IHO.  
E-mail: hiriart@iho-argentina.com.ar

Recibido: 11 de agosto de 2015.  
Aceptado: 21 de agosto de 2015.  
Taurus Año 17, N° 68:

## Reproductive biotechnologies: *in vivo* and *in vitro*, yesterday and today

### Summary

Superovulation (SOV) from females of high genetic value combined with artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in low genetic merit females have become in the main system of production of elite bovine embryos *in vivo* in Argentina. On the other hand, the generation of embryos by *in vitro* fertilization (IVF) of oocytes recovered by follicular aspiration (OPU, from ovum pick-up) from cow ovaries of commercial interest, also combined with ET, is increasing its application in our country. In the “*in vitro* group”, where embryos are generated under laboratory conditions, it is possible to list more sophisticated techniques, such as cloning or nuclear transfer (NT) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). NT allows generation of identical copies of an organism, and with animal transgenesis, has numerous applications in animal production, pharmaceutical and biomedical industry. ICSI, however, is currently more restricted to the production of human embryos in assisted reproduction clinics, although attempts are remarkably increasing in the equine.

As reproductive biotechnologies is also possible to include almost forgotten techniques, such as identical twins production by splitting embryos (either surgical cut or blastomeres disaggregation) and the production of chimeras.

Also, embryo cryopreservation has played a key role in the implementation of reproductive biotechnologies. Advances in embryo cryopreservation techniques had yielded better results, allowing independence of biological time and synchronization protocols, and also had enabled transport and market between countries of different continents.

**Keywords:** artificial insemination; *in vitro* fertilization; embryo transfer; cloning; cryopreservation.

---

### 1. Introducción

#### 2. Producción de embriones *in vivo*

##### 2.1. Superovulación

##### 2.2. Inseminación artificial

##### 2.3. Transferencia de embriones

#### 3. Producción de embriones *in vitro*

##### 3.1. Aspiración folicular

##### 3.2. Fecundación *in vitro*

##### 3.3. Clonación y transgénesis

#### 4. Multiplicación de embriones

#### 5. Quimeras

##### 5.1. Complementación trofoblástica

#### 6. Criopreservación de embriones

##### 6.1. Congelamiento tradicional

##### 6.2. Vitrificación

#### 7. Bibliografía

---

### 1. Introducción

El conocimiento de la fisiología del desarrollo ha permitido comenzar a manipular el sistema reproductor de la hembra. La biotecnología de la reproducción comprende técnicas que permiten aumentar y mejorar la eficiencia reproductiva de los animales. En las últimas décadas, la reproducción del ganado bovino ha evolucionado de manera acelerada y este incremento se debe fundamentalmente a la necesidad de aumentar la producción de leche y carne, conforme a las necesidades de consumo de la población en constante crecimiento. En este sentido, las biotecnologías reproductivas aplicadas a estos sectores han permitido contribuir tanto al incremento

rápido del número de animales como a su mejoramiento genético. La producción de embriones mediante estas técnicas pueden dividirse en dos grupos principales: la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*.

### 2. Producción de embriones *in vivo*

#### 2.1. Superovulación

La SOV es una tecnología que permite manipular la onda folicular de los animales <sup>(6, 11, 12, 13)</sup>, permitiendo la ovulación de múltiples folículos en aquellas especies mono o biovulatorias, como el bovino, el ovino y el equino. Mediante la administración de hormonas es posible evitar la atresia folicular de aquellos folículos subordinados, permitiendo la superovulación <sup>(11)</sup>. Una de las hormonas más utilizadas para este objetivo es la FSH <sup>(6, 12)</sup>. También se emplean otras con el mismo efecto, como la gonadotropina coriónica equina (eCG) o FSH recombinantes <sup>(93)</sup>. De esta manera, el efecto más importante es la estimulación del crecimiento del folículo dominante y, con eso, el aumento en la tasa de ovulación <sup>(93)</sup>. Además de la estimulación del crecimiento folicular, resulta importante sincronizar las ovulaciones mediante el empleo de hormonas con efecto LH. Sin embargo, la respuesta superovulatoria resulta muy variable debido a tres factores principales: el protocolo empleado, la hembra estimulada y su medio ambiente <sup>(60)</sup>. Entre otros factores intervinientes en estos tratamientos, resulta esencial el control de la condición nutricional de la hembra donante. Durante el amamantamiento

to, el balance energético de la donante es negativo, ya que gran parte de su energía es destinada a la producción de leche <sup>(123)</sup>. En el mismo sentido, para obtener resultados óptimos es necesario garantizar una oferta de alimentos sin restricciones para que las hembras equilibren el balance energético durante el período de servicio <sup>(14)</sup>.

## 2.2. Inseminación artificial

La IA es una de las técnicas reproductivas de mayor aplicación, junto con la congelación de semen. Ha permitido disminuir las enfermedades infecciosas transmitidas a través de la cópula y obtener mayor descendencia de un macho, aprovechando el uso de reproductores. Durante la monta natural, el toro deposita miles de millones de espermatozoides en la vagina de la hembra. Sin embargo, el cérvix resulta un obstáculo, por lo que normalmente solo 1% de los espermatozoides eyaculados consigue llegar al cuerpo uterino. En la IA, normalmente el semen es depositado directamente en el útero, disminuyendo la cantidad de espermatozoides necesarios <sup>(63)</sup>. En el caso de empleo de semen sexado se recomienda una inseminación más profunda, dado su menor calidad comparada con el semen convencional <sup>(19)</sup>.

Los protocolos actuales de IA buscan liberarse de la necesidad de detectar celo para realizar la práctica a través de la implementación de tratamientos de sincronización. En este sentido, la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) también permite trabajar con un mayor número de hembras <sup>(21, 37, 42)</sup> y facilita la ejecución de la superovulación <sup>(12)</sup>.

## 2.3. Transferencia de embriones

La TE es otra biotecnología en constante desarrollo y se la asocia con protocolos de SOV e IA de hembras donantes con genética de calidad. Sin embargo, en los últimos años también ha tenido alto impacto debido a la creciente producción de embriones *in vitro* (PIV). La TE es una estrategia que aumenta considerablemente el número de descendencia materna, aumentando el progreso genético <sup>(101)</sup>. Asimismo, la congelación y almacenamiento de embriones han permitido manejar más libremente el uso de receptoras en un programa de TE, como también transportar y comercializar internacionalmente material genético con la seguridad de que los embriones se encuentran libres de patógenos <sup>(68)</sup>.

## 3. Producción de embriones *in vitro*

### 3.1. Aspiración folicular

La técnica de OPU surgió a partir de una adaptación de un método de aspiración folicular en humanos <sup>(87)</sup>. A partir de entonces fue posible su implementación en programas de vacas vivas <sup>(57)</sup>. La OPU, combinada con la PIV, está aumentando y mejorando la producción de embriones a partir de donantes seleccionadas en vida <sup>(43)</sup>. Asimismo, la OPU permite disminuir el intervalo generacional a partir de la aspiración tanto de ovarios de terneras o vaquillonas prepúberes <sup>(31, 40, 80, 96)</sup>, como también de vacas preñadas <sup>(2, 4)</sup>.

El ovario es un órgano dinámico. Entre individuos existe una gran variabilidad respecto de los folículos antrales y preantrales, y de la cantidad de oocitos en los ovarios. En este sentido, la raza o la subespecie pueden ejercer una gran influencia. Por ejemplo, las razas europeas (*Bos taurus*) tienen un número menor de folículos antrales y oocitos en comparación con razas índicas (*Bos indicus*) <sup>(20, 51, 88, 89)</sup>. Este hecho puede ser el motivo principal por el cual Brasil, con su amplia diseminación de ganado índico, ha logrado desarrollar exitosamente procedimientos de OPU combinados con FIV a gran escala <sup>(104, 114)</sup>. Sin embargo, existe repetitividad entre individuos, independientemente de la edad, la raza, el estadio de lactación o la estación de monta <sup>(20)</sup>, aumentando el abanico de aplicación en razas europeas. Incluso ha sido determinado que el pool de folículos pre-antrales en un ovario tiene alta correlación con los folículos antrales y con la fertilidad <sup>(76)</sup>. Se presume también cierto grado de heredabilidad hacia las hijas. El empleo de ultrasonografía <sup>(56)</sup> y análisis genómicos <sup>(74, 99)</sup> para la selección de hembras con mayor cantidad de oocitos está permitiendo identificar los animales con mejores características reproductivas.

### 3.2. Fecundación *in vitro*

La fecundación es un proceso complejo que implica la penetración de un espermatozoide capacitado en un oocito maduro, restableciendo la carga cromosómica somática e iniciando el desarrollo embrionario. La FIV consiste en realizar este proceso fuera del tracto genital femenino, controlando simultáneamente que la maduración ovocitaria y el posterior cultivo *in vitro* se lleven a cabo de una manera correcta. La FIV es la técnica

ca de reproducción asistida que más se asemeja a la concepción natural. Fue desarrollada en los años 60 en animales de laboratorio y se empleó con éxito por primera vez en 1978 en seres humanos. En bovinos, la primera FIV exitosa fue realizada por Brackett y col. <sup>(18)</sup>, utilizando oocitos madurados *in vivo* y recuperados quirúrgicamente.

Antes de adquirir su capacidad fecundante, los espermatozoides deben sufrir una preparación que normalmente ocurre en el tracto genital femenino <sup>(82, 83)</sup>. Principalmente, se trata de cambios que involucran la capacitación del espermatozoide y la reacción acrosómica. De esta forma, ocurre una alteración inicial de la membrana plasmática espermática que permite que se desarrolle la segunda fase, donde se fusionan la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa <sup>(97)</sup>. Actualmente, a pesar de contar con un alto desarrollo en los medios de cultivo y los protocolos de trabajo, los resultados de FIV continúan siendo variables cuando se usan diferentes toros <sup>(132)</sup>. Existen diferencias en la motilidad, capacitación y reacciones acrosómicas de los espermatozoides, que terminan en un efecto macho que afectan las tasas de fertilización y, con ello, el desarrollo de embriones *in vitro* <sup>(3)</sup>.

La PIV ha permitido cultivar embriones hasta estadios transferibles, evitando la TE quirúrgica y disminuyendo los costos. Particularmente, combinada con la obtención de oocitos de vacas en pie (por OPU) permite acelerar el proceso reproductivo, ya que una vaca puede ser satisfactoriamente empleada como donante cada semana <sup>(43, 109)</sup>; también permite utilizar donantes de alto valor genético que no responden a tratamientos de SOV o incluso con problemas de fertilidad. Asimismo, permite la obtención de un alto número de embriones y reduce el número de espermatozoides viables necesarios para fecundar en comparación con la IA o el servicio natural. A su vez, las gametas pueden estar conservadas bajo técnicas de criopreservación y es posible controlar y decidir su aplicación <sup>(68)</sup>. Por otro lado, el uso de espermatozoides con el sexo deseado (empleo de semen sexado) ha permitido seleccionar el sexo de las crías de acuerdo a los objetivos establecidos <sup>(53, 54, 65, 131)</sup>; evitando la complejidad de las biopsias de embriones preimplantatorios seguidas de análisis moleculares para la detección del sexo de las

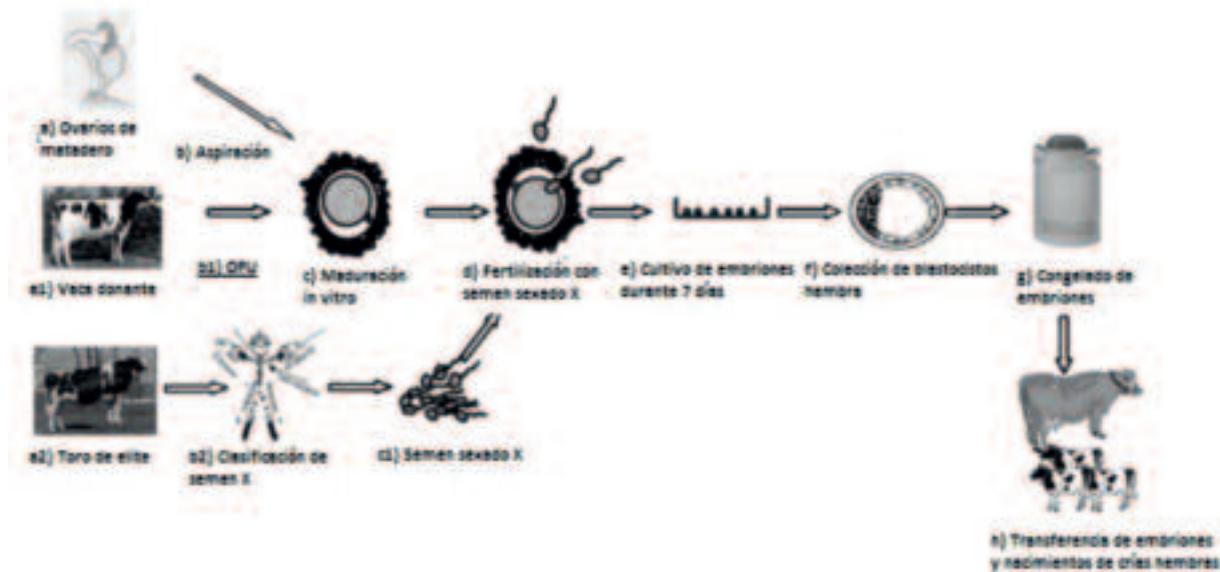
blastómeras extraídas <sup>(67)</sup> y las pérdidas de fetos del sexo no deseado, detectado por ecografía.

La FIV con semen sexado aumenta los rendimientos por pajuela sexada y posibilita, por ejemplo, aumentar la producción de terneras en un rodeo lechero. En un procedimiento típico de FIV con semen sexado (Figura 1), los oocitos son colectados de ovarios de matadero con o sin información de pedigree <sup>(1, 127, 131)</sup>, o de animales vivos a través de aspiración folicular. Por el lado masculino, espermatozoides de toros de elite se separan y clasifican por citometría de flujo y clasificación de células (más conocida en inglés como *cell sorting*), en el proceso de sexado de semen <sup>(53, 54)</sup>. Los espermatozoides portadores del cromosoma sexual X (especialmente para rodeos lecheros, donde se prefieren las hembras) son usados para fecundar oocitos maduros. Los embriones derivados de este procedimiento son cultivados *in vitro* hasta el estadio de blastocisto (día 7), después de lo cual se transfieren frescos a hembras receptoras debidamente sincronizadas o se criopreservan <sup>(130)</sup>.

### 3.3. Clonación y transgénesis

La clonación y la transgénesis con fines medicinales permiten utilizar animales como fuentes de producción de proteínas farmacológicas relevantes para la salud humana <sup>(24, 95)</sup>.

La clonación es un proceso mediante el cual se logra un organismo con la misma información genética que un individuo existente. Se trata de un tipo de reproducción asexual, cuya principal aplicación es obtener una copia de un animal de gran valor, ya sea en el ámbito económico (como en equinos y bovinos) como sentimental (mascotas). El primer mamífero clonado por la técnica de TN, a partir de una célula somática adulta y especializada de la glándula mamaria, fue la reconocida oveja Dolly <sup>(125)</sup>. Desde entonces numerosas publicaciones han reportado resultados de clonación en diferentes especies. Cumulina fue el primer clon de ratón obtenido de células del cúmulus de oocitos <sup>(118)</sup>. En Argentina, en 2002, nació Pampa, el primer clon vacuno de la raza Jersey generado por Salamone <sup>(95)</sup>. Un año más tarde fue reportado el nacimiento de la yegua Prometea, el primer clon equino generado a partir de células de su propia madre <sup>(41)</sup>. Con el transcurso del tiempo, la técnica de clonación fue



**Figura 1.** Esquema del procedimiento de FIV con semen sexado. (a) Ovarios de matadero con o sin información de pedigree. (b) Los oocitos son extraídos por punción folicular, (c) se seleccionan y se someten a maduración *in vitro*. Como una alternativa, (a1) pueden emplearse vacas con información de pedigree completa, con o sin un tratamiento de estimulación hormonal previo a la punción. (b1) Los oocitos son colectados por OPU. (a2) Un toro de elite se selecciona para separar y clasificar sus espermatozoides, según contengan el cromosoma X o Y. (b2) El semen colectado es clasificado por citometría de flujo. (c1) Los espermatozoides X se usan para FIV en rodeos lecheros. (d) Los oocitos maduros son fertilizados con semen sexado hembra (X). (e) Los embriones son cultivados *in vitro* durante 7 días y, posteriormente (f) son evaluados morfológicamente. (g) Los blastocistos obtenidos pueden ser criopreservados o bien (h) transferidos a vacas receptoras previamente sincronizadas para obtener crías del sexo femenino. (Modificado de 130).

mejorando, aunque no a la velocidad que se especuló, resultando en un procedimiento más ineficiente de lo que se esperaba. Aún así las investigaciones continúan centradas en aumentar el rendimiento y disminuir tanto las altas tasas de mortalidad como las anomalías congénitas que afectaron a muchos de los animales previamente mencionados. En bovinos se han descrito problemas asociados a la clonación, agrupados como el “síndrome de la cría grande” (LOS, del inglés *large offspring syndrome*)<sup>(62, 102)</sup>.

Otra aplicación interesante de la TN es la recuperación de individuos de especies amenazadas. En 2009 se logró el nacimiento, aunque poco satisfactorio, del primer clon de un animal extinto: el bucardo<sup>(38)</sup>. Actualmente, centros de investigación se están centrando en la clonación terapéutica, que tendría múltiples aplicaciones en humanos. El estudio de los sistemas relacionados con el desarrollo embrionario *in vitro* permitirá superar las limitaciones de las biotecnologías actuales.

Por otro lado, la transgénesis es una herramienta de ingeniería genética que permite insertar una molécula de material genético exógeno (ADN) en un organismo que normalmente no la

posee. El primer nacimiento de un mamífero transgénico correspondió a un ratón generado por microinyección pronuclear (en estadio unicelular)<sup>(44)</sup>. Desde entonces varios sistemas de producción de transgénicos han sido desarrollados: TN<sup>(24, 95)</sup>; inyección citoplasmática con vectores espermáticos<sup>(84)</sup>, retrovirales y lentivirales<sup>(47)</sup>; inyección de células madre embrionarias (CME)<sup>(100)</sup>; y microinyección de vesículas<sup>(7, 84)</sup>. Sin embargo, la producción de especies domésticas genéticamente modificadas continúa siendo altamente ineficiente debido al mosaicismo (excepto en la técnica de TN o inyección de CME) producido cuando solo algunas de las células del embrión incorporan el transgén<sup>(85)</sup>, o bien lo hacen con diferente número de copias<sup>(8)</sup>.

#### 4. Multiplicación de embriones

Los embriones tempranos de mamífero tienen un amplio potencial de desarrollo. En los años 80, la bisección de embriones permitió generar gemelos a partir de un único embrión. En Argentina, los primeros mellizos homocigotas producidos por división microquirúrgica fueron obtenidos por el equipo de Palma y correspondie-

ron a terneros de la raza Aberdeen Angus <sup>(61)</sup>. En estos procedimientos, embriones post-compactación son cortados con una cuchilla microquirúrgica de metal <sup>(124)</sup> o con una fina aguja de vidrio <sup>(122)</sup>. Sin embargo, las desventajas radican en las pérdidas celulares ocasionadas por el daño físico de los instrumentos, que genera demi-embriones con menos de la mitad de las células del embrión original. De esta manera, se producen blastocistos con bajo número de células, que disminuyen los porcentajes de preñez luego de ser transferidos. El uso de animales gemelos en experimentación animal puede reducir sustancialmente los números requeridos para generar información estadísticamente válida <sup>(10)</sup>.

Por otra parte, particularmente en bovinos, fue posible comprobar que hasta la mitad de las células de embriones de 2 a 16 células pueden ser removidas, sin perder la capacidad de desarrollo del embrión original <sup>(64)</sup>. La posibilidad de disminuir la cantidad de blastómeras de un embrión es el fundamento de procedimientos tan ampliamente empleados en la actualidad, como las biopsias y el sexado de embriones <sup>(67)</sup>. En el mismo sentido, incluso blastómeras individuales de embriones murinos de 8 células han permitido generar líneas de células madre (CM) <sup>(23, 116)</sup>, indicando persistencia de la pluripotencialidad, a pesar de haber activado previamente su genoma embrionario.

Asimismo, la generación de 2 y 4 crías idénticas bovinas <sup>(121, 108)</sup>, ovinas <sup>(120)</sup> y de conejos <sup>(75)</sup> a partir de embriones de 2, 4 y 8 células, demuestra claramente la totipotencialidad de dichas células. En general, los mecanismos empleados se basan en la separación de las células del embrión temprano mediante micromanipulación y su posterior introducción en ZP vacías, implicando la transferencia transitoria en oviductos para permitir el desarrollo embrionario <sup>(55, 121)</sup>. Sin embargo, Vajta y col. <sup>(112)</sup> generaron el sistema de cultivo de micropozos en placa denominado WOW (del inglés, *Well of the Well*) <sup>(112)</sup>. De esta manera, es posible realizar el cultivo de embriones libres de zona pelúcida (LZP), concentrando factores autócrinos y parácrinos en las depresiones, como ocurre en las gotas convencionales de cultivo. De la misma manera, las microdepresiones evitan la separación natural de los embriones causada por la ausencia de uniones intercelulares durante las

primeras divisiones mitóticas. Recientemente, Tagawa y col. <sup>(108)</sup> combinaron el sistema de cultivo WOW con la desagregación de blastómeras mediante pipeteo, obteniendo resultados más alentadores que, por ejemplo, la bisección con microcuchilla.

Sin embargo, el estadio en el cual comienza la expresión genómica del embrión podría representar una limitante en la multiplicación de embriones. Este es el momento en el cual el embrión activa su genoma y comienza a controlar su desarrollo, luego de una fase de transición materno-embriónica, en la cual el embrión deja de depender de los transcriptos maternos (acumulados en el oocito) para empezar a generar los propios <sup>(60)</sup>. Varios autores afirman que, en el bovino, la AGE ocurre en la mitad del estadio de 8 células <sup>(25, 39, 73)</sup>.

## 5. Quimeras

En la mitología griega, la quimera es una bestia con la cabeza de un león, el cuerpo de una cabra y la cola de un dragón (Homero, *La Ilíada*) (Figura 2). Actualmente, en biología, el término quimera se aplica a la mezcla de células derivadas de más de un animal <sup>(91)</sup>.

Los embriones quiméricos tienen diversas aplicaciones. En el campo de la ciencia son herramientas interesantes para el estudio del desarrollo temprano y la diferenciación en mamíferos <sup>(72)</sup> y la introducción de CM transgénicas en blastocistos <sup>(45, 90)</sup>. Las quimeras interespecíficas



**Figura 2.** Quimera de la mitología griega. En la mitología griega, la quimera es una bestia con la cabeza de un león, el cuerpo de una cabra y la cola de un dragón.

también ofrecen la posibilidad de estudiar incompatibilidades reproductivas entre especies y neutralizarlas <sup>(36)</sup>.

Existen dos técnicas básicas para la producción de embriones quiméricos: la inyección de blastocistos y la agregación de embriones. En 1983, Summers realizó ambos procedimientos entre las razas Friesian y Angus (*Bos taurus*) con Brahman (*Bos indicus*). En aquel momento la inyección de macizo celular interno (MCI) en la cavidad de blastocistos representó la mejor opción; pero fue sugerido que las condiciones de cultivo de los embriones agregados LZP eran inapropiadas <sup>(106)</sup>. Las agregaciones se han realizado en tubos con medio de cultivo <sup>(106)</sup>, en ZP de oocitos <sup>(35)</sup> o de embriones microquirúrgicamente vaciadas <sup>(15, 86)</sup> o con embriones LZP <sup>(112, 128, 129)</sup>. Adicionalmente, Wood y col. <sup>(128)</sup> realizaron quimeras mediante el cocultivo de una capa de CM con varios embriones en estadio de 8 células en la especie murina. Fue posible obtener nacimientos a través de este simple procedimiento, permitieron determinar quimerismo incluso en la línea germinal.

Hasta el advenimiento de las tecnologías del ADN recombinante, el quimerismo intraespecífico se vio limitado, dada la baja disponibilidad de marcadores especie-específicos. En bovinos, Picard y col. <sup>(86)</sup> emplearon un marcador cromosómico de un toro suizo rojo y blanco que cuenta con una traslocación heterocigota 1/29 en los cromosomas sexuales para inseminar hembras Holando y Hereford. En su trabajo, embriones generados de esta manera fueron agregados con embriones fertilizados con semen de toro normal. Luego, el análisis cromosómico de linfocitos permitió determinar el tipo de quimerismo <sup>(86)</sup>. Por su parte, el quimerismo interespecífico admite determinar las localizaciones celulares por la evaluación de los genomas de cada especie <sup>(91, 92)</sup>. Fehilly y col. <sup>(34)</sup> realizaron análisis citogenéticos de linfocitos de sangre umbilical y de las quimeras obtenidas para identificar el quimerismo de las crías.

Para el caso de las quimeras entre CM y embriones, Wood y col. <sup>(128)</sup> concluyen en que no existen diferencias significativas entre los procedimientos de inyección y agregación, pero resalta la simplicidad de esta última, requiriendo únicamente de una pipeta Pasteur y un entrenamiento básico en la manipulación de embriones.

## 5.1. Complementación trofoblástica

La complementación trofoblástica es una estrategia que surge de la necesidad de aumentar la actividad funcional de las agregaciones embrionarias. Los embriones poliploides (particularmente tetraploides o  $4n$ ) han sido ampliamente utilizados en este sentido, para compensar la letalidad embrionaria, como resultado de fenotipos cuyos tejidos extraembrionarios son defectivos o bien para la generación de embriones derivados de CM <sup>(79)</sup>.

En agregados diploides/tetraploides ( $2n/4n$ ), las células  $4n$  son seleccionadas negativamente durante el desarrollo de los tejidos fetales <sup>(66)</sup>, pero persisten en las membranas extraembrionarias <sup>(110)</sup>. Rossant y col. <sup>(91)</sup> sugirieron la importancia del genotipo trofoblástico para la sobrevivencia de las quimeras. En su experiencia, las quimeras murinas interespecíficas entre *Mus musculus* y *Mus caroli* generadas por inyección de MCI en blastocistos, únicamente producían descendencia viable cuando el genotipo *Mus musculus* del TrE se correspondía con el de la madre sustituta. Entonces, se sugiere que las interacciones trofoblasto-útero son fundamentales para la sobrevivencia de las quimeras luego de su implantación y que los componentes del trofoblasto de *Mus musculus* estarían protegiendo a las células de *Mus caroli* del rechazo inmunológico materno.

Existen dos métodos básicos para la generación de embriones  $4n$ : el uso de citocalasina B <sup>(110, 111)</sup> y la electrofusión <sup>(26, 107)</sup>. La citocalasina B inhibe la división citoplasmática, pero permite la división nuclear <sup>(22)</sup>. Sin embargo, tienen altas tasas de mosaicismo entre embriones  $2n$  normales y  $4n$  <sup>(110)</sup>. En cambio, la electrofusión ha producido una población de células  $4n$  mucho más homogénea en otras especies, como el ratón y el conejo.

Según Snow, los embriones murinos  $4n$  permiten una implantación rápida, pero unos pocos llegan a término <sup>(103)</sup>. Sin embargo, los últimos avances en las técnicas y medios de cultivo han permitido obtener tasas de desarrollo a blastocisto semejantes a las de los embriones normales en bovinos <sup>(26)</sup>.

Varios intentos han sido reportados en ovinos y bovinos para mejorar la placentación de los animales clonados, mediante la producción de embriones quiméricos, pero los resultados de

nacimientos no variaron respecto de la clonación tradicional <sup>(15, 52, 78, 94)</sup>. Contrariamente, en ratón se han observado buenas tasas de desarrollo usando CM (con impronta normal) con complementación trofoblástica <sup>(33, 61)</sup>.

En las placentas bovinas existen naturalmente células binucleadas. Éstas se localizan en todo el TrE, generalmente en asociación con uniones por microvellosidades que separan el trofoblasto del epitelio materno <sup>(32)</sup>. De la misma manera, la frecuencia de células poliploides en el disco embrionario y en el TrE de embriones día 7 producidos *in vitro* es del 50%; mientras que disminuye al 20% en embriones producidos *in vitro* que fueron transferidos tempranamente a úteros de vacas recipientes. En este último caso, los análisis estadísticos reflejan que la distribución de las células poliploides es significativamente mayor en el TrE que en el disco embrionario <sup>(115)</sup>.

Recientemente han sido reportados nacimientos de ratones adultos generados a partir de la agregación de células somáticas inducidas a la indiferenciación o iPSc (del inglés, *induced pluripotent stem cells*) y células 4n <sup>(16)</sup>. Estos agregados fueron quimeras transitorias, dado que las crías nacidas estuvieron constituidas únicamente por células 2n. En la actualidad, con el desarrollo de nuevos conocimientos en términos de clonación animal, complementación trofoblástica y técnicas LZP ha sido posible combinar diversas estrategias para lograr desarrollar un sistema de clonación embrionaria. Recientemente, bajo la hipótesis de que a partir de una blastómera en estadio de 8 células es posible producir embriones viables, se plantearon quimeras como un sistema transitorio para la multiplicación de blastómeras individuales de embriones bovinos (incapaces de alcanzar el estadio de blastocisto independientemente) <sup>(49)</sup>.

## 6. Criopreservación de embriones

La criopreservación de embriones se encuentra relacionada con la TE y la PIV. Se trata de una estrategia ampliamente utilizada, ya que permite el almacenamiento potencialmente infinito de embriones para que puedan ser comercializados y transferidos en el momento más oportuno <sup>(105)</sup>. Los primeros mamíferos criopreservados satisfactoriamente correspondieron a ratones <sup>(119)</sup> y, un año después, fue reportado el primer nacimiento de un embrión bovino congelado <sup>(126)</sup>.

Desde entonces, fueron desarrollados nuevos protocolos basados en dos técnicas principales: el congelamiento tradicional y la vitrificación.

El nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  es el medio de elección para conservar embriones criopreservados. Se considera que los embriones pueden ser mantenidos 200 años sin afectar su viabilidad ni causar daños genéticos <sup>(71)</sup>. Sin embargo, durante la criopreservación, los embriones sufren daños cuya severidad depende de factores como el tamaño y la forma de las células, la permeabilidad de las membranas y la calidad y sensibilidad de la estructura que sufre el proceso (oocito o embrión) <sup>(113)</sup>. Para minimizar estos problemas se emplean agentes crioprotectores, que son solutos orgánicos que ayudan a proteger las organelas celulares; aunque muchas veces perjudican la organización del citoesqueleto, resultan tóxicos o generan un daño osmótico <sup>(30)</sup>. Se han realizado varios intentos para disminuir la toxicidad y aumentar la permeabilidad de los agentes crioprotectores, usando combinaciones de los mismos, adicionándolos en distintos puntos del proceso y congelando las muestras con alta concentración de los mismos <sup>(113)</sup>. Entre los crioprotectores más usados se encuentra el dimetil-sulfóxido (DMSO), el etilenglicol (EG) y el glicerol (G). Asimismo, se ha observado que los azúcares como la glucosa, la tehalosa y otros glúcidos pueden actuar como criopreservantes naturales <sup>(117)</sup>.

Una de las principales limitantes de la aplicación masiva de la criopreservación de embriones de PIV ha sido su mayor sensibilidad a la criopreservación con respecto a aquellos embriones producidos *in vivo* <sup>(60)</sup>, posiblemente debido a su mayor contenido lipídico <sup>(5, 27, 28, 77)</sup>. Asimismo, los embriones producidos *in vivo*, tanto congelados como vitrificados, tienen tasas de preñeces semejantes para ambas técnicas; mientras que los embriones de PIV toleran mejor la vitrificación <sup>(50)</sup>. Otro factor que afecta la eficiencia de la criopreservación es el estadio del desarrollo embrionario en el cual se realiza el proceso <sup>(70)</sup>, siendo el blastocisto expandido el estadio más conveniente <sup>(46, 48)</sup>.

### 6.1. Congelamiento tradicional

Actualmente, el congelamiento tradicional es la técnica de criopreservación de mayor difusión. El procedimiento se encuentra totalmente estandarizado y automatizado por equipamientos

comerciales. Durante el congelamiento, la velocidad de disminución de la temperatura permite el intercambio de crioprotectores ente los espacios intra y extracelulares. El control de la velocidad de enfriamiento permite que el agua extracelular cristalice, aumentando el gradiente osmótico que extrae el agua dentro de la célula <sup>(98)</sup> y eliminando casi completamente la formación de hielo intracelular que dañaría severamente los componentes celulares. Los embriones congelados son fácilmente transferibles tras realizar el descongelamiento de la pajuela donde se encuentran conservados durante unos minutos en agua a 37°C. Las tasas de supervivencia de las muestras producidas *in vivo* por SOV e IA suelen ser altas y los embriones sobreviven intactos.

## 6.2. Vitrificación

La vitrificación es una técnica de criopreservación de embriones y oocitos altamente utilizada, principalmente en condiciones experimentales. Se consigue mediante un enfriamiento muy rápido en una solución cuya viscosidad aumenta con el descenso de temperatura hasta la formación de un estado sólido amorfo, sin estructura cristalina u organizada. El procedimiento consiste en conseguir un contacto directo entre la solución vitrificante (con el agente crioprotector) y el nitrógeno líquido. Para lograr un gran cambio de temperatura a gran velocidad (enfriamiento ultrarrápido, mayor a 500°C/min) se usa un volumen mínimo de medio (reportado entre 0,1 y 1 µL) y nitrógeno líquido a -196°C. La exposición y las tasas de congelación deben ser lo suficientemente rápidas para evitar la toxicidad y la formación de cristales intracelulares que puedan dañar el contenido celular. Antes del calentamiento, el material biológico debe equilibrarse con la solución crioprotectora (en menor concentración) para que pueda soportar el choque osmótico.

Existen diferentes técnicas de vitrificación de embriones, basadas en los mismos principios y prácticamente sin ventajas entre ellas. Con el objetivo de minimizar el volumen de medio congelado y garantizar un enfriamiento ultrarrápido surgieron las técnicas de redes o rejillas de microscopía electrónica <sup>(69)</sup>, las pajuelas abiertas y estiradas (OPS, del inglés *open pulled straws*) <sup>(17)</sup>, los bucles de congelamiento o cryoloops <sup>(59)</sup> y el método de *CryoTip*® <sup>(60)</sup>. El método de vitrifica-

ción en superficie sólida (SSV, del inglés *solid surface vitrification*) <sup>(29)</sup> evita la formación de vapores.

La vitrificación no requiere de aparatos de congelamiento ni de alto entrenamiento, y principalmente elimina el riesgo de daños celulares debido a que las altas velocidades de enfriamiento y calentamiento no dan tiempo a que ocurran. Por lo tanto, se trata de una técnica con características competitivas respecto del congelamiento tradicional. Sin embargo, las desventajas de la vitrificación radican en el impedimento para hacer transferencia directa de los embriones preservados <sup>(113)</sup>, la posibilidad de transmisión de enfermedades durante el contacto con nitrógeno líquido no estéril <sup>(9)</sup> y la ausencia de un protocolo estandarizado <sup>(113)</sup>.

## 5. Bibliografía

1. Aller, J.F., Alberio, R.H., Palma, G.A. 2000. Gestation with *in vitro* produced embryos from oocytes of ovariectomized cows. Arch.Med.Vet.; 1:33-39.
2. Aller, J.F., Mucci, N.C., Kaiser, G.G., Callejas, S.S., Alberio, R.H. 2012. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. Anim. Reprod. Sci.; 133(1-2):10-15.
3. Aoyagi, Y., Fujii, K., Iwazumi, Y., Furudate, M., Fukui, Y., Ono, H. 1988. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. Theriogenology; 30:973-985.
4. Argov, N., Arav, A., Sklan, D. 2004. Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. Theriogenology; 61(5):947-962.
5. Barceló-Fimbres, M., Seidel, G.E. Jr. 2007. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation *in vitro*. Mol. Reprod. Dev.; 74(11):1406-1418.
6. Baruselli, P.S., Sá Filho, M.F., Martins, C.M., Nasser, L.F., Nogueira, M.F.G., Barros, C.M., Bó, G.A. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. Theriogenology; 65:77-88.
7. Bevacqua, R.J., Pereyra-Bonnet, F., Olivera, R., Hiriart, M.I., Sipowicz, P., Fernandez-Martín, R., Radrizzani, M., Salamone, D.F. 2012. Production of IVF transgene-expressing bovine embryos using a novel strategy based on cell cycle inhibitors. Theriogenology; 78:57-68.
8. Bevacqua, R.J., Canel, N.G., Hiriart, M.I., Sipowicz, P., Rozenblum, G.T., Vitullo, A., Radrizzani, M., Fernandez Martin, R., Salamone, D.F. 2013. Simple gene transfer technique based on I-SceI meganuclease and cytoplasmic injection in IVF bovine embryos. Theriogenology; 80(2):104-113.
9. Bielanski, A., Nadin-Davis, S., Sapp, T., Lutze-Wallace, C. 2000. Viral contamination of embryos cryopreserved in

- liquid nitrogen. *Cryobiology*; 40(2):110-116.
10. Biggers, J.D. 1986. The potential use of artificially produced monozygotic twins for comparative experiments. *Theriogenology*; 26(1):1-25.
  11. Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*; 43:31-40.
  12. Bó, G.A., Baruselli, P.S., Chesta, P., Martins, C.M. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*; 65:89-101.
  13. Bó, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., Mapletoft, R.J. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*; 57:53-72.
  14. Bó, G.A., Cutaia, L., Peres, L.C., Pincinato, D., Maraña, D., Baruselli, P.S. 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*; 64:223-236.
  15. Boediono, A., Suzuki, T., Li, L.Y., Godke, R.A. 1999. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*; 53(2):159-170.
  16. Boland, M.J., Hazen, J.L., Nator, K.L., Rodriguez, A.R., Gifford, W., Martin, G., Kupriyanov, S., Baldwin, K.K. 2009. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*; 461(7260):91-94.
  17. Booth, P.J., Vajta, G., Høj, A., Holm, P., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. 1999. Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress. *Theriogenology*; 51(5):999-1006.
  18. Brackett, B.G., Bousquet, D., Boic, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., Dressel, M.A. 1982. Normal development following fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*; 27:147-158.
  19. Buchanan, B.R., Seidel, G.E. Jr, McCue, P.M., Schenk, J.L., Herickhoff, L.A., Squires, E.L. 2000. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*; 53(6):1333-1344.
  20. Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L., Knight, P.G., Ireland, J.J. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.*; 73(1):54-62.
  21. Caraviello, D.Z., Weigel, K.A., Fricke, P.M., Wiltbank, M.C., Florent, M.J., Cook, N.B., Nordlund, K.V., Zwald, N.R., Rawson, C.L. 2006. Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. *J. Dairy Sci.*; 89(12):4723-4735.
  22. Carter, S.B. 1967. Effects of cytochalasin on mammalian cells. *Nature*; 213:261-264.
  23. Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S.J., Johnson, J., Meisner, L., Lanza, R. 2006. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*; 439:216-219.
  24. Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, F.A., Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*; 280:1256-1258.
  25. Crosby, I.M., Gandolfi, F., Moor, R.M. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.*; 82(2):769-775.
  26. Curnow, E.C., Gunn, L.M. and Trounson, A.O. 2000. Electrofusion of two-cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*; 56:372-377.
  27. De La Torre-Sánchez, J.F., Gardner, D.K., Preis, K., Gibbons, J., Seidel, G.E. Jr. 2006b. Metabolic regulation of *in vitro*-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reprod. Fertil. Dev.*; 18(5):597-607.
  28. De La Torre-Sánchez, J.F., Preis, K., Seidel, G.E. Jr. 2006a. Metabolic regulation of *in vitro*-produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. *Reprod. Fertil. Dev.*; 18(5):585-596.
  29. Dinnyés, A., Dai, Y., Jiang, S., Yang, X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*; 63(2):513-518.
  30. Dobrinsky, J.R. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*; 57(1):285-302.
  31. Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Fissore, R.A., Robl, J.M. 1996. Prepubertal calves as oocyte donors: promises and problems. *Theriogenology*; 45:121-130.
  32. Duello, T.M., Byatt, J.C., Bremel, R.D. 1986. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology*; 119(3):1351-1355.
  33. Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W.M. 3rd, Yanagimachi, R., Jaenisch, R. 2001. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 98(11):6209-6214.
  34. Fehilly, C.B., Willadsen, S.M., Dain, A.R., Tucker, E.M. 1985. Cytogenetic and blood group studies of sheep/goat chimaeras. *J. Reprod. Fert.*; 74:215-221.
  35. Fehilly, C.B., Willadsen, S.M., Tucker, E.M. 1984b. Experimental chimaerism in sheep. *J. Reprod. Fertil.*; 70(1):347-351.
  36. Fehilly, C.B., Willadsen, S.M., Tucker, E.M. 1984a. Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature*; 307(5952):634-636.
  37. Fernandes, P., Teixeira, A.B., Crocci, A.J., Barros, C.M. 2001. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2alpha and estradiol benzoate (EB). *Theriogenology*; 55(7):1521-1532.
  38. Folch, J., Cocero, M.J., Chesné, P., Alabart, J.L., Domínguez, V., Coggié, Y., Roche, A., Fernández-Arias, A., Martí, J.I., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J.F., Bonastre, A.S., Vignon, X. 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*; 71(6):1026-1034.
  39. Frei, R.E., Schultz, G.A., Church, R.B. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J. Reprod. Fertil.*; 86(2):637-641.

40. Fry, R.C., Simpson, T.L., Squires, T.J. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without FSH/GnRH. *Theriogenology*; 49: 1077-1082.
41. Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R., Lazzari, G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*; 424(6949):635.
42. Galvão, K.N., Sá Filho, M.F., Santos, J.E. 2007. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.*; 90(9):4212-4218.
43. García, A., Salaheddine, M. 1998. Effect of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*; 50:575-585.
44. Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 77:7380-7384.
45. Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., Kemler, R. 1986. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 3(23):9065-9069.
46. Han, Y.M., Yamashina, H., Koyama, N., Lee, K.K., Fukui, Y. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. *Theriogenology*; 42(4):645-654.
47. Haskell, R.E., Bowen, R.A. 1995. Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol. Reprod. Dev.*; 40, 386-390.
48. Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E., Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*; 43:141-152.
49. Hiriart, M.I., Bevacqua, R.J., Canel, N.G., Fernández-Martín, R., Salamone, D.F. 2013. Production of chimeric embryos by aggregation of bovine egfp eight-cell stage blastomeres with two-cell fused and asynchronous embryos. *Theriogenology*; 80(4):357-364.
50. Inaba, Y., Aikawa, Y., Hirai, T., Hashiyada, Y., Yamanouchi, T., Misumi, K., Ohtake, M., Somfai, T., Kobayashi, S., Saito, N., Matoba, S., Konishi, K., Imai, K. 2011. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *J. Reprod. Dev.*; 57(4):437-443.
51. Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod.*; 22:1687-1695.
52. Iwasaki, S., Campbell, K.H., Galli, C., Akiyama, K. 2000. Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos. *Biol. Reprod.*; 62(2):470-475.
53. Johnson, L.A. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim. Reprod. Sci.*; 60-61:93-107.
54. Johnson, L.A., Flook, J.P., Look, M.V., Pinkel, D. 1987. Flow sorting of X and Y chromosome bearing into two populations. *Gamete Res.*; 16:1-9.
55. Johnson, W.H., Loskutoff, N.M., Plante, Y., Betteridge, K.J. 1995. Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an *in vitro* derived four-cell embryo. *Vet. Rec.*; 137:15-16.
56. King, A.M. 2006. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. *Vet. J.*; 171:408-420.
57. Kruip, T.A., Pieterse, M.C., van Beneden, T.H., Vos, P.L., Würth, Y.A., Taverne, M.A. 1991. A new method for bovine production: a potential alternative to superovulation. *Vet. Rec.*; 128(9):208-10.
58. Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, S.P. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online*; 11(3):300-388.
59. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK (1999). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.*; 72(6):1073-1078.
60. Leibo, S.P., Loskutoff, N.M. 1993. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:81-94.
61. Li, X., Yu, Y., Wei, W., Yong, J., Yang, J., You, J., Xiong, X., Qing, T., Deng, H. 2005. Simple and efficient production of mice derived from embryonic stem cells aggregated with tetraploid embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2005; 71(2):154-158.
62. Liu, J., Wang, Y., Su, J., Luo, Y., Quan, F., Zhang, Y. 2013. Nuclear donor cell lines considerably influence cloning efficiency and the incidence of large offspring syndrome in bovine somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Domest. Anim.*; 48(4):660-664.
63. López-Gatius, F. 2000. Site of semen deposition in cattle: a review. *Theriogenology*; 53:1407-1414.
64. Loskutoff, N.M., Johnson, W.H., Betteridge, K.J. 1993. The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology*; 39:95-107.
65. Lu, K.H., Seidel, Jr., G.E. 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocysts development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology*; 62:819-830.
66. Lu, T.Y., Market, C.L. 1980. Manufacture of diploid/tetraploid chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 77:6012-6016.
67. Macháty, Z., Páldi, A., Csáki, T., Varga, Z., Kiss, I., Bárándi, Z., Vajta, G. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*; 98(2):467-470.
68. Mapletoft, R.J., Hasler, J.F. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*; 24:393-403.
69. Martino, A., Songsasen, N., Leibo, S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol. Reprod.*; 54(5):1059-1069.
70. Massip, A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Domest. Anim.*; 36(2):49-55.
71. Mazur, P., Schneider, U. 1986. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys.*; 8(4):259-285.
72. McLaren, A. 1975. Sex chimaerism and germ cell distribution in a series of chimaeric mice. *J. Embryol. Exp. Morph.*; 33(1):205-216.
73. Memili, E., First, N.L. 1999. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol. Reprod.*

- 61:1198-1207.
74. Meuwissen, T.H., Hayes, B.J., Goddard, M.E. 2001. Genetics; 157(4):1819-1829.
  75. Moore, N.W., Adams, C.E., Rowson, L.E.A. 1968. Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. J.Reprod.Fertil; 17:527-531.
  76. Mossa, F., Walsh, S.W., Butler, S.T., Berry, D.P., Carter, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Ireland, J.J., Evans, A.C. 2012. Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. J. Dairy Sci.; 95(5):2355-2361.
  77. Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J., Alberio, R.H. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. Theriogenology; 65(8):1551-62.
  78. Murakami, M., Ferguson, C.E., Perez, O., Boediono, A., Paccamonti, D., Bondioli, K.R., Godke, R.A. 2006. Transfer of inner cell mass cells derived from bovine nuclear transfer embryos into the trophoblast of bovine *in vitro*-produced embryos. Cloning Stem Cells; 8(1):51-60.
  79. Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Ivanyi, E., Markkula, M., Rossant, J. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. Development; 110:815-821.
  80. Palma, G.A. 2001. Biotecnología de la Reproducción. Primera Edición. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). p.1-505.
  81. Palma, G.A., Alberio, R., Brem, G. 1991. Moderne reproductionstechniken in der extensiven tierhaltung in argentinien. Fortschritte in der Tierzucht G. Brem (Ed.), Ulmer Verlag, 381-411.
  82. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eystone, W.H. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology; 25:591-600.
  83. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Winer, M.A., First, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod.; 38:1171-1180.
  84. Pereyra-Bonnet, F., Bevacqua, R., La Rosa, I., Sipowicz, P., Radrizzani, M., Fernandez-Martin, R., Salamone, D.F. 2011. Novel methods to induce exogenous gene expression in SCNT, IVF and parthenogenic bovine embryos. Transgenic Res.; 20(6):1379-88. Erratum in: Transgenic Res. 2011; 20(6):1389.
  85. Perry, A.C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., Yanagimachi, R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science; 284:1180-1183.
  86. Picard, L., Chartrain, I., King, W.A., Betteridge, K.J. 1990. Production of chimaeric bovine embryos and calves by aggregation of inner cell masses with morulae. Mol. Reprod. Dev.; 27(4):295-304.
  87. Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruij, T.A., Taverne, M.A. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology; 30(4):751-62.
  88. Pontes, J.H.F., Melo-Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubin, K.C.P., Seneda, M.M. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. Theriogenology; 75:1640-1646.
  89. Pontes, J.H.F., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Ereno-Junior, J.C., Uvo, S., Barreiros, T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., Seneda, M.M. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. Theriogenology; 71:690-697.
  90. Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M. 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. Nature; 323(6087):445-448.
  91. Rossant, J., Croy, B.A., Chapman, V.M., Siracusa, L., Clark, D.A. 1982. Interspecific chimeras in mammals: a new experimental system. J. Anim. Sci.; 55(5):1241-1248.
  92. Ruffing, N.A., Anderson, G.B., Bondurant, R.H., Currie, W.B., Pashen, R.I. 1993. Effects of chimerism in sheep-goat concepti that developed from blastomere-aggregation embryos. Biol. Reprod.; 48:889-904.
  93. Sá Filho, M.F., Ayres, H., Ferreira, R.M., Marques, M.O., Reis, E.L., Silva, R.C., Rodrigues, C.A., Madureira, R.H., Bó, G.A., Baruselli, P.S. 2010. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. Theriogenology; 73:651-658.
  94. Saito, S., Sawai, K., Ugai, H., Moriyasu, S., Minamihashi, A., Yamamoto, Y., Hirayama, H., Kageyama, S., Pan, J., Murata, T., Kobayashi, Y., Obata, Y., Yokoyama, K.K. 2003. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.; 309(1):104-113.
  95. Salamone, D., Barañao, L., Santos, C., Bussmann, L., Artuso, J., Werning, C., Prync, A., Carbonetto, C., Dabsys, S., Munar, C., Salaberry, R., Berra, G., Berra, I., Fernández, N., Papouchado, M., Foti, M., Judewicz, N., Mujica, I., Muñoz, L., Alvarez, S.F., González, E., Zimmermann, J., Criscuolo, M., Melo, C. 2006. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. J. Biotechnol.; 124:469-472.
  96. Salamone, D.F., Damiani, P., Fissore, R.A., Robl, J.M., Duby, R.T. 2001. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. Biol. Reprod.; 64(6):1761-1768.
  97. Sánchez, R., Deppe, M., Schulz, M., Bravo, P., Villegas, J., Morales, P., Risopatrón, J. 2011. Participation of the sperm proteasome during *in vitro* fertilisation and the acrosome reaction in cattle. Andrologia; 43(2):114-120.
  98. Saragusty, J., Arav, A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reproduction; 141(1):1-19.
  99. Schaeffer, L.R. 2006. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. J. Anim. Breed. Genet.; 123:218-223.
  100. Shiue, Y.L., Liou, J.F., Shiau, J.W., Yang, J.R., Chen, Y.H., Tailiu, J.J., Chen, L.R. 2006. *In vitro* culture period but not the passage number influences the capacity of chimera production of inner cell mass and its deriving cells from porcine

- embryos. *Anim. Reprod. Sci.*; 93:134-143.
101. Smith, C. 1988. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*; 29:203-12.
  102. Smith, L.C., Suzuki, J. Jr., Goff, A.K., Filion, F., Therrien, J., Murphy, B.D., Kohan-Ghadr, H.R., Lefebvre, R., Brisville, A.C., Buczinski, S., Fecteau, G., Perecin, F., Meirelles, F.V. 2012. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod. Domest. Anim.*; 47 Suppl. 4:107-114.
  103. Snow, M.H.L. 1975. Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation. *Embryol. Exp. Morph.*; 34(3):707-721.
  104. Stroud, B. 2012. IETS 2012 Statistics and data retrieval committee report. Champaign, IL: IETS.
  105. Sudano, M.J., Santos, V.G., Tata, A., Ferreira, C.R., Paschoal, D.M., Machado, R., Buratini, J., Eberlin, M.N., Landim-Alvarenga, F.D. 2012. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Biol. Reprod.*; 887(6):130.
  106. Summers, P.M., Shelton, J.N., Bell, K. 1983. Synthesis of primary *Bos taurus-Bos indicus* chimaeric calves. *Anim. Reprod. Sci.*; 6:91-102.
  107. Suo, L., Wang, F., Zhou, G.B., Shi, J.M., Wang, Y.B., Zeng, S.M., Tian, J.H., Zhu, S.E., Liu, G.S. 2009. Optimal concentration and electric field levels improve tetraploid embryo production by electrofusion in mice. *J. Rep. Dev.*; 55(4):383-385.
  108. Tagawa, M., Matoba, S., Narita, M., Saito, N., Nagai, T., Imai, K. 2008. Production of monozygotic twin calves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system. *Theriogenology*; 69:574-582.
  109. Taneja, M., Bols, P.E.J., Van de Velde, A., Ju, J.-C., Schreiber, D., Tripp, M.W., Levine, H., Echelard, Y., Riesen, J., Yang, X. 2000. Development competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol. Reprod.*; 62:206-213.
  110. Tarkowsky, A.K., Witkowska, K., Opas, J. 1977. Development of cytochalasin-B induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mice embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*; 41:47-64.
  111. Ueda, O., Jishage, K., Kamada, N., Satomi, U., Suzuki, H. 1995. Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos. *Exp. Anim.*; 44(3):205-210.
  112. Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*; 60-61:357-364.
  113. Vajta, G., Kuwayama, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*; 65(1):236-244.
  114. Viana, J.H.V. 2012. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *OEmbrião*; 51:6-10.
  115. Viuff, D., Palsgaard, A., Rickords, L., Lawson, L.G., Greve, T., Schmidt, M., Avery, B., Hyttel, P., Thomsen, P.D. 2002. Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol. Reprod. Dev.*; 62(4):483-488.
  116. Wakayama, S., Hikichi, T., Suetsugu, R., Yuko, S., Bui, H.T., Mizutani, E., Wakayama, T. 2007. Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells*; 25:986-993.
  117. Wakayama, S., Ohta, H., Hikichi, T., Mizutani, E., Iwaki, T., Kanagawa, O., Wakayama, T. 2008. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 105(45):17318-17322.
  118. Wakayama, S., Ohta, H., Hikichi, T., Mizutani, E., Iwaki, T., Kanagawa, O., Wakayama, T. 2008. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 105(45):17318-17322.
  119. Whittingham, D.G., Leibo, S.P., Mazur, P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*; 178(4059):411-414.
  120. Willadsen, S.M. 1981. The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*; 15:165-172.
  121. Willadsen, S.M., Polge, C. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Rec.*; 108:211-213.
  122. Willadsen, S.M., Godke, R.A. 1984. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.*; 114(10):240-243.
  123. Williams, C.J. 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum. Reprod. Update*; 8:313-321.
  124. Williams, T.J., Elsdon, R.P., Seidel, Jr. G.E. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*; 22:521-531.
  125. Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*; 385:810-813. Erratum in: *Nature* 1997.
  126. Wilmut, I., Rowson, L.E. 1973. The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. *J. Reprod. Fertil.*; 33(2):352-353.
  127. Wilson, R.D., Weigel, K.A., Fricke, P.M., Rutledge, J.J., Leibfried-Rutledge, M.L., Matthews, D.L., Schutzkus, V.R. 2005. *In vitro* production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes selected cullcows. *J. Dairy Sci.*; 88(2):776-782.
  128. Wood, S.A., Allen, N.D., Rossant, J., Auerbach, A., Nagy, A. 1993b. Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature*; 365(6441):87-89.
  129. Wood, S.A., Pascoe, W.S., Schmidt, C., Kemler, R., Evans, M.J., Allen, N.D. 1993a. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 90(10):4582-4585.
  130. Xu, J., Chaubal, S.A., Du, F. 2009. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology*; 71:39-47.
  131. Xu, J., Guo, Z., Su, L., Nedambale, T.L., Zhang, J., Schenk, J., Moreno, J.F., Dinnyés, A., Ji, W., Tian, X.C., Yang, X., Du, F. 2006. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.*; 89(7):2510-2518.
  132. Zhang, M., Lu, K.H., Seidel Jr, G.E. 2003. Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*; 60:1657-1663.