

CAPÍTULO XXV

APLICACIÓN DE BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS EN LA MEJORA DE LAS GANADERÍAS BOVINAS

- I. INTRODUCCIÓN
- II. PRODUCCIÓN *IN VIVO* DE EMBRIONES
- III. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES
- IV. ELECCION DEL SEXO
 1. Sexado del semen
 2. Sexado de los embriones producidos *in vitro*
- V. OTRAS BIOTECNOLOGIAS: Transgénesis y clonación
- VI. ACTIVIDAD ACTUAL EN EUROPA
- VII. LITERATURA CITADA

Julio de la Fuente Martínez

I. INTRODUCCIÓN

La Transferencia de Embriones (TE) desde hace una serie de años viene siendo utilizada como herramienta para acelerar el progreso genético de las poblaciones animales multiplicando a las hembras superiores, aunque su mayor auge se ha dado en el Sector de producción láctea bovina, un alto porcentaje de las superovulaciones llevadas a cabo en Europa han sido realizadas sobre bovinos de producción cárnica. Los programas MOET (múltiple ovulación y transferencia de embriones) se han puesto en marcha para incrementar los niveles genéticos de las poblaciones bovinas. Los animales nacidos en el programa son registrados por la Asociación Nacional y registradas sus producciones en el Control Lechero Oficial. Después de un periodo de 8 años los animales nacidos de embriones dentro del programa se han colocado en el 2% mejor de la población bovina española en control (226.700 animales).

En los momentos actuales se está dando un cierto grado de utilización de las técnicas de manipulación embrionaria, por lo que ya se puede pensar en introducir en los programas de mejora los embriones producidos *in vitro*, con el consiguiente descenso de los costes por embrión transferido y el incremento del número de embriones que pueden llegar a obtenerse de una donante determinada. Asociadas a la tecnología de la fecundación *in vitro* se puede comenzar a pensar en la predeterminación del sexo de los futuros productos, hecho de gran importancia tanto desde el punto de vista genético como del económico. Otras biotecnologías emergentes y de un gran interés, no solo desde la perspectiva de la producción animal sino también en cuanto a la producción farmacéutica y clínica humana, son la producción de animales transgénicos y de clones (originados a partir de células embrionarias y somáticas).

Las estadísticas de la actividad europea en TE de los últimos años muestran un crecimiento anual, por lo que se puede decir que las biotecnologías reproductivas en el ganado bovino no han alcanzado aún su techo y con la utilización futura de las nuevas tecnologías, los niveles de mejora genética aumentarán y con ellos los beneficios obtenidos por los ganaderos. En otros países con menores estructuras ganaderas, las biotecnologías reproductivas pueden ser una gran ayuda a la hora de planificar producciones futuras, adecuándose de forma rápida y efectiva a entornos cambiantes.

II. PRODUCCIÓN *IN VIVO* DE EMBRIONES

En sus comienzos la TE fue utilizada de forma esporádica para multiplicar los animales superiores, pero desde los trabajos de Nicholas y Smith en

1983 [72], se ha visto la posibilidad de trabajar de una forma mas concreta en poblaciones determinadas a través de los denominados Grupos de Múltiple Ovulación y Transferencia de Embriones (Grupos MOET). Los objetivos marcados en el programa se centran en dos direcciones: a) la vía macho: para suministrar sementales al programa de testaje en descendencia y b) la vía hembra: para proporcionar hembras de reposición de alto valor genético a los ganaderos superovulando a sus mejores animales.

Durante los años 1990 a 1996 se han superovulado dentro de nuestros proyectos 637 animales, de los cuales 375 fueron vacas adultas y 262 novillas. La superovulación ha sido realizada con diferentes hormonas folículoestimulantes de origen porcino, ovino y equino, adaptando su dosificación a la edad y el estado fisiológico de cada tipo de animal. La superovulación se ha realizado durante cuatro días en dosis decrecientes y a intervalos de 12 h. (en el caso de la eCG en una sola inyección), comenzándose entre el día 9 a 11 después de la detección de un celo natural o provocado. El celo fue inducido con una inyección de análogos de la Prostaglandina F_2 a las 48h de iniciado el tratamiento superovulatorio. Se realizaron dos inseminaciones artificiales a las 12 y 24 horas de la aparición del celo en las donantes. Los embriones han sido recolectados por lavado uterino transvaginal en el 7º día postcelo, siendo manipulados y valorados según las normas de Sociedad Internacional de TE [42].

Los embriones han sido transferidos en fresco (inmediatamente a su obtención) o congelados para su posterior transferencia. La congelación se realizó en una solución fosfato-salina (PBS) al 0.4% de albúmina sérica bovina y 1.4M de glicerol ó 1.5M de etilenglicol. Una vez incluidos los embriones en la solución de congelación fueron introducidos en pajuelas de inseminación de 0.25 ml, sometidos al cambio de estado a los -6.5°C y a un descenso de temperatura de $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. hasta los -35°C , temperatura a la que fueron sumergidos en nitrógeno líquido para su conservación. La descongelación ha sido realizada en tres pasos de concentración decreciente del crioprotector con la adición de 0.3M sacarosa o en un solo paso en 1M sacarosa. Los embriones congelados con etilenglicol han sido transferidos directamente sin previa dilución del crioprotector (TD). La implantación de los embriones se ha realizado sobre novillas de 15 a 18 meses de edad, a los 6-7 días del celo (contando como día 0 el día del celo) por vía transvaginal previa anestesia epidural y al cuerno ipsilateral del ovario ovulado. Dada la carencia de receptoras en nuestro país un reducido número de animales fueron transferidos después de haber sido observado un celo natural. Al resto de los animales se les provocó la aparición del celo, bien mediante un tratamiento tradicional con análogos de la Prostaglandina F_2 , o mediante la inserción de un dispositivo intravaginal con 1550 mg de progesterona mas 5 mg de estradiol $17-\beta$ y 2 g de Progesterona (im), inyectando al 4º día 1000 UI de eCG y 48h después una dosis de Prostaglandina

F₂. La selección de las novillas ha sido realizada primeramente por la observación de las manifestaciones de celos y en el día de la transferencia mediante exploración rectal de los ovarios determinando la existencia de un cuerpo lúteo (CL), utilizando solo aquellos animales calificados con 1 ó 2 (baremo de 1 a 3) según el tamaño y configuración del CL [73]. En los animales receptores superovulados solo fueron desechados aquellos que presentaron un elevado número de quistes foliculares anovulatorios.

Los resultados obtenidos durante estos años han arrojado un promedio de 6 a 8 embriones totales y de 4 a 5 embriones viables (transferibles) por colecta, alcanzándose una tasa de viabilidad (emb.viables x 100/emb totales) del 55 al 60%. El promedio de gestaciones en los últimos tres años ha sido del 52% (134/258), 56% (159/284) y del 57% (167/294) [23], no encontrándose diferencias significativas entre los diferentes sistemas de sincronización de las receptoras, en los embriones transferidos en fresco o congelados, ni tampoco entre los descongelados en varios pasos o por TD [17]. Sin embargo, la tasa de rechazo de animales presentados para su transferencia resultó menor en los que fueron superovulados [23]. Otros grupos, trabajando igualmente en condiciones de campo, han descrito una disminución del 5% de las gestaciones obtenidas al transferir embriones directamente [77].

Los resultados reproductivos se corresponden con los promedios obtenidos en los diferentes países europeos (ver mas adelante), mientras que la aportación relevante a la cabaña nacional ha sido realizada desde el punto de vista genético por los animales nacidos dentro del programa, ya que aunque la vía hembra es menos importante en el progreso genético global, es a nivel de explotación la que mas interesa al ganadero. Así en la valoración genética de CONAFE de Enero-1997, la media de los índices genéticos de las vacas nacidas de TE dentro de los Grupos se encuentra entre el 1.5% de las mejores vacas de España. Sus índices genéticos por grupos, así como sus datos productivos se expresan en los Cuadros 1 y 2. En el Cuadro 1 puede apreciarse claramente la ventaja que representa trabajar dentro de los Grupos MOET, frente a la TE individual, ya que los animales nacidos en aquellos se sitúan en el 1.5% mejor de la población, mientras que en el otro caso solo alcanzan el 20% [24].

Igualmente y para los parámetros: Índice genético de kilos de leche (IGKL), de kilos de grasa (IGKG), kilos de proteína (IGKP), índice compuesto (ICO) y de producción (ICOP), así como para la calificación final (IGCF), todos los valores de los animales procedentes de TE resultan muy superiores a los de la población en sus mismas ganaderías y frente a la población de las vacas en control lechero en el País Vasco (23.229 animales) y a la totalidad del resto de España (226.693 animales) agrupadas en CONAFE (Cuadro 1).

CUADRO 1. COMPARACIÓN DE LOS ÍNDICES GENÉTICOS DE LOS ANIMALES NACIDOS POR TE.

Grupo MOET	Explot	Vacas	IGKL	IGKG	IGKP	ICOP	IGCF	ICO	Mejor
Todas vacas	35	7.873	237	8.4	6.3	210	0.31	281	40%
Vacas TE	35	92	792	26	24	808	0.96	1.071	1,5%
No MOET									
Todas Vacas	3	90	101	3.7	1.8	59	0.42	146	50%
Vacas TE	3	29	337	12	9	286	0.83	507	20%
País Vasco		23.229	66	2.88	1.27	43	0.15	75	50%
CONAFE		226.693	79	3.68	2.68	94	0.06	126	50%

Datos CONAFE-Enero/97.

En cuanto a las producciones de los animales nacidos de TE dentro de los Grupos MOET, cabe destacar que producen en promedio 1.010 kg. de leche mas que sus compañeras de establo, 1.816 kg. mas que las hembras en control del País Vasco y 1.239 kg. mas que el promedio nacional. Producen mas kilos de grasa con un similar porcentaje de grasa. Hoy día al ser la proteína el componente mas apreciado por el ganadero, también en este apartado los animales provenientes de TE de los Grupos MOET ofrecen una mayor calidad frente a sus compañeras (38 Kg.), a las del País Vasco (65 Kg.) y a las del resto del Estado (44 Kg.); también se aprecian ligeramente superiores los porcentajes de proteína (Cuadro 2).

CUADRO 2. DATOS PRODUCTIVOS EN LACTACIÓN ESTÁNDAR (305D) EN LOS GRUPOS MOET.

	Kg Leche	Kg Grasa	% Grasa	Kg Prot	% Prot
Vacas TE	8524	315	3.69	270	3.16
Todas vacas	7514	287	3.7	232	3.08
País Vasco	6708	252	3.76	205	3.06
CONAFE	7285	264	3.62	116	3.09

Datos CONAFE-Enero/97.

De los resultados obtenidos durante este periodo de tiempo se puede concluir que los grupos MOET son la mejor herramienta para potenciar las posibilidades de mejora genética que ofrece la TE en la actualidad. Dado el número de animales con los que se ha trabajado y la repetibilidad y consistencia de los resultados obtenidos, este tipo de esquema podría servir de modelo para otras poblaciones de número similar o incluso superior de efectivos.

III PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

La producción *in vitro* de embriones en ganado bovino es un área que ha experimentado una gran expansión en los últimos años, desde que en 1982 se describiera por primera vez el nacimiento de un ternero a partir de ovocitos recogidos de matadero, madurados e inseminados en el laboratorio [6], lo cual supuso la posibilidad de aprovechar los gametos femeninos a un nivel mayor que lo permitido por las metodologías desarrolladas hasta la fecha, y hacer de estos una herramienta dentro de los programas de mejora genética [61]. Así mismo permitió utilizar un material que hasta ese momento no tenía ninguna aplicación. A partir de ese momento, y como consecuencia de la dedicación de diferentes grupos investigadores en todo el mundo, se ha logrado la maduración y fecundación de ovocitos de bovinos con muy variadas metodologías experimentales y medios de cultivo [28]. Sin embargo, salvo contadas excepciones, difícilmente se logra sobrepasar el 30-40% de blastocistos a partir de ovocitos madurados [87], y en las mejores condiciones y dadas las limitaciones técnicas actuales, se suele obtener un blastocisto por ovario de matadero, lo cual es extremadamente limitado si se tiene en cuenta la población de miles de ovocitos teóricamente disponibles.

Para que esta metodología sea una herramienta con impacto real a nivel comercial, ya sea a través de planes de mejora genética, o como medio directo de producción, aún hay que solucionar una serie de problemas técnicos. Se ha escrito mucho sobre los factores limitantes de la metodología, y aunque están perfectamente identificados, la importancia relativa de uno u otro puede variar de acuerdo con la propia experiencia del laboratorio o las circunstancias técnicas en las que debe ser aplicada. Además los resultados no siempre son consistentes y hay diversos elementos (raza, individuo) que introducen mucha variabilidad en el éxito de la técnica de fecundación *in vitro*.

Los primeros estudios trataron de recuperar los ovocitos a partir de los ovarios de forma inmediata para asegurar la máxima viabilidad pensando que la degeneración era inmediata. Sin embargo, es posible retrasar este proceso hasta 8 horas si los ovarios se mantienen a temperatura ambiente [107], lo que da un buen margen de tiempo cuando el matadero y el laboratorio de

procesamiento no están próximos, y con ovarios mantenidos a 30°C la recuperación de los ovocitos a las 4 horas del sacrificio proporcionó índices de desarrollo hasta blastocisto incluso mejores que con recuperación inmediata [4]. Posiblemente un tema mucho más importante para aumentar la eficacia del proceso reside en realizar una selección de los ovocitos, desechando los que presenten un cúmulo mínimo y un citoplasma heterogéneo [37]. La morfología de los cúmulos no está determinada intrínsecamente, un aspecto definitivo es el sistema de extracción de los ovocitos a partir de los folículos. En principio se recurrió a la disección de los ovocitos, aunque el sistema rutinario actualmente es la aspiración [27]. Recientes estudios han demostrado que factores como el diámetro de la aguja utilizada o la presión de aspiración son determinantes de la calidad de los ovocitos obtenidos, y por tanto, de la tasa de recuperación global y lo que es más importante, del número de blastocistos obtenido por ovario aspirado [22].

La fuente más frecuente de ovocitos proviene de ovarios de matadero, sobre los cuales se han desarrollado diferentes métodos de colección de ovocitos, así se pueden coleccionar por medio de una simple aspiración con aguja y jeringa, con la ayuda de una bomba de vacío o por medio de disección. Estos métodos de colección de ovocitos solo pueden ser utilizados en animales muertos o por ovariectomía, no siendo obviamente repetibles sobre un mismo animal. Como sistema alternativo de recuperación de ovocitos se ha desarrollado la aspiración de estos a partir de los ovarios de animales vivos; inicialmente fueron utilizadas técnicas quirúrgicas como la laparoscopia y la laparotomía con la desventaja de ser costosas y requerir de un equipo complejo y anestesia del paciente [16, 85]. Durante la década de los 80 la técnica de ecografía-guía se comenzó a utilizar como método de colección de ovocitos en mujeres. Inicialmente se utilizó para guiar una aguja de punción percutánea por vía transabdominal [58], más tarde se la utilizó por vía transvesical [100] y finalmente por vía transvaginal [108]. Este método fue descrito por primera vez en los bovinos en 1988 [81], siendo actualmente utilizado por la mayoría de los Centros para la producción de embriones *in vitro* [36].

En un principio la obtención de ovocitos para FIV se utilizó sobre vacas problema de alto valor genético [62]. Las candidatas ideales eran todas aquellas hembras en las que la superovulación no era factible por diferentes causas anatómicas (oviductos bloqueados, metritis persistentes) o causas fisiológicas (vacas viejas o refractarias a los tratamientos de superovulación). En la actualidad estas técnicas se están utilizando sobre vacas con buen estado de salud y de alto valor genético dado que la colección de ovocitos se puede hacer hasta dos veces por semana [26]. Es también posible realizar la colección de ovocitos de vacas preñadas durante el primer trimestre de la gestación sin trastorno alguno para el feto y sobre vacas en el período temprano del post

parto, ya que los ovarios poseen folículos que potencialmente se pueden desarrollar hasta estadios de embriones transferibles [49].

Han sido utilizados diferentes tipos y formas de agujas de aspiración, aunque las más comúnmente utilizadas son las de 60 cm de longitud, de 17, 18 ó 20G y ángulo corto. Se ha de utilizar una bomba de aspiración de presión controlada para producir una presión en el tubo de colección con el fin de provocar un flujo constante de aspiración por minuto. El porcentaje de ovocitos colectados por folículo punzado está directamente relacionado con la presión de aspiración, así al evaluar diferentes velocidades de flujo (11, 22, 33 y 60 ml/min) con ovarios provenientes de matadero, se demostró que la velocidad de 22 ml/min era la más adecuada [13], dando la mayor cantidad y calidad de ovocitos (valorados según el número de capas de células de la granulosa).

Los folículos pueden ser punzados en cualquier momento del ciclo estral, pero la calidad y cantidad de estos puede variar significativamente dado que los folículos disponibles en el ovario es variable a lo largo del ciclo estral. La cantidad de ovocitos colectados en los animales no estimulados dependerá exclusivamente del día del ciclo del animal (siendo máximo al comienzo de una onda folicular). No obstante ha sido descrito que los ovocitos de los folículos atrésicos o en fase de regresión entran en un proceso de degeneración o también llamado de pseudomaduración. El número de folículos presentes en el ovario se puede incrementar con el uso de gonadotropinas folículo estimulantes (FSH, eCG, etc.). En los animales superovulados se encontraron diferencias significativas en las tasas de colección al utilizar FSH durante 3 días frente a 12 horas antes de la colección y el tratamiento con LH incrementó el número de ovocitos colectados por folículo aspirado (54% sin LH frente al 66% con LH). La calidad de los ovocitos también se alteró, encontrándose un mayor porcentaje de ovocitos con cúmulos expandido en el grupo con LH [13]. Se han llevado a cabo dos colecciones semanales con o sin estimulación hormonal exógena sin comprometer la fertilidad futura de los animales [96, 98].

Después de una aspiración folicular los animales muestran ciclos normales pero cuando son sometidos a continuas aspiraciones durante un tiempo prolongado los ciclos estrales son alterados (de 10 días o de 25-30 días), dependiendo de la presencia o ausencia de tejido luteal [98]. Posteriormente a la aspiración los ovarios fueron observados por ecografía transrectal apareciendo a las 24h pequeñas masas altamente ecogénicas dentro de los folículos, los cuales se mantuvieron presentes por 3 ó 4 días. Estas masas midieron entre 1 a 5 mm y aparecieron rodeadas de líquido folicular en cantidad variable. En las terneras de 6 meses de edad fueron analizadas por cortes histológicos e interpretadas como hematomas intrafoliculares dado que no produjeron progesterona circulante comparadas con los animales control no aspirados [13].

Otros estudios han demostrado un engrosamiento de la cápsula del ovario y un aumento del tejido cicatrizal [82, 96].

Dado que los animales gestantes poseen ondas de crecimiento folicular similares a los animales que no lo están [3], producir embriones *in vitro* a partir de animales gestantes es una posibilidad única que puede realizarse durante los tres primeros meses de gestación, dado que posteriormente los ovarios no son físicamente accesibles por vía transvaginal debido al peso del feto. La cantidad de ovocitos dependerá de la cantidad de folículos presentes en el ovario, demostrándose que las vacas respondían a tratamientos de estimulación con FSH, de forma que se puede incrementar significativamente la cantidad de folículos en el ovario. Sin embargo en este caso es preciso adaptar las metodologías a la especial idiosincrasia de cada raza, estudiando no solo el momento y ritmo más adecuado de recuperación, sino también el entorno endocrino que favorece la viabilidad de los ovocitos.

Además cuenta con la ventaja de no estar tan limitada por la edad de la donante o su estado reproductivo [61]. De esta forma es posible no sólo recuperar ovocitos de animales impúberes [11, 13], sino también de animales gestantes o incluso infértiles pero con actividad ovárica [54]. Por este sistema además se pueden realizar recuperaciones periódicas aumentando de forma considerable la aportación femenina a los planes de mejora genética, especialmente en animales que responden de manera limitada a los tratamientos de superovulación [10]. La recuperación de razas autóctonas también puede verse favorecida por esta metodología, ya que permitirá aumentar de forma considerable la fuente de ovocitos que no pueden obtenerse del matadero, por lo menos en cantidad suficiente.

Cuando aumenta la producción de ovocitos, sobre todo si se recurre a la aspiración transvaginal, surge un nuevo problema, la baja disponibilidad de receptoras puede significar el desaprovechamiento de los recursos genéticos obtenidos. Este problema puede abordarse de dos formas diferentes, bien congelando los ovocitos recuperados o los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, la primera posibilidad, aunque de un desarrollo muy limitado en la literatura científica, cuenta con un atractivo adicional sobre la congelación de embriones, y es que con la puesta a punto de una metodología adecuada, se podría superar la barrera actual de solo disponer de ovocitos de una hembra durante la vida de esta. Con la congelación de ovocitos se aumentan considerablemente las herramientas para incrementar la variabilidad genética de una raza, especialmente cuando sus efectivos son limitados, permitiendo el intercambio genético con machos de varias generaciones posteriores.

Los estudios previos en este campo indican que aunque posible, la efectividad es muy baja, con menos del 3% de ovocitos descongelados capaces de desarrollarse hasta blastocistos [67]. Se ha logrado obtener una gestación a par-

tir de un ovocito congelado con propanodiol [76], pero está ampliamente demostrado que los ovocitos son especialmente sensibles a la disminución de temperatura, sin llegar a la congelación, produciéndose graves alteraciones estructurales [75]. Normalmente éstas son mas graves cuando se trata de congelar ovocitos inmaduros (vesícula germinal) que los maduros [21, 56].

Para que la utilización de los embriones obtenidos por FIV sea económicamente rentable, es preciso garantizar su conservación a largo plazo, al igual que ocurrió con la TE, mejorando su supervivencia a los procesos de congelación y descongelación hasta alcanzar cifras semejantes a las obtenidas con embriones producidos *in vivo*. Sin embargo, se ha demostrado como los embriones producidos *in vitro* son mas sensibles a las bajas temperaturas que los producidos *in vivo* [57]. Una de las diferencias más evidentes es la sensibilidad de los embriones procedentes de FIV a temperaturas entre 15 y 0°C , especialmente marcada en la fase de mórula. Ningún embrión producido *in vitro* en esta fase de desarrollo fue capaz de sobrevivir a estas temperaturas, mientras que los obtenidos *in vivo* si lo hicieron [83]. Hay otras diferencias que también condicionan el manejo de estos embriones, la menor densidad de embriones procedentes de FIV hace que estos floten en soluciones de crioprotectores en las que los obtenidos *in vivo* se hunden rápidamente, lo que aparentemente refleja un contenido relativo de lípidos/proteínas diferente en estos dos tipos de embriones [83].

Afortunadamente la congelabilidad de los embriones producidos *in vitro* puede mejorarse, al tratarse de una característica íntimamente relacionada con las condiciones de cultivo *in vitro* en las que se han generado los embriones. En particular, el co-cultivo con células BRL o procedentes del oviducto demuestran un claro efecto beneficioso [69], lo mismo que el hecho de que los embriones que muestran un desarrollo más rápido *in vitro*, son también los que sobreviven en mayor medida a la congelación [68]. La explicación puede residir en el hecho de que los embriones desarrollados en presencia de cocultivos celulares, son también aquellos que tienen un mayor número de células [94]. Sin embargo, la interacción con cultivos celulares, especialmente cuando se trata de células oviductales obtenidas también a partir de material de matadero, tiene unos posibles problemas sanitarios que desaconsejan su utilización [91]. En esa tónica, muchos grupos han tratado de identificar medios definidos que soporten un buen desarrollo embrionario eliminando elementos susceptibles de transmitir agentes patógenos, tanto en el cultivo [18, 79] como en la congelación [78].

La especial sensibilidad de los embriones producidos *in vitro* al enfriamiento han sugerido que como en el caso de los ovocitos, la vitrificación puede ser una alternativa válida [19, 44], pero hay un amplio margen de mejora dentro de los sistemas tradicionales de congelación, ya sea optimizando las

condiciones de cultivo, o definiendo concentraciones de crioprotectores y sistemas de incorporación y retirada de los mismos en condiciones que disminuyan su toxicidad o detectando las fases de desarrollo embrionario mas propicias a la crioconservación.

En numerosos laboratorios se ha identificado que el origen del semen constituye uno de los factores limitantes en la estandarización de la fecundación *in vitro* y la obtención de un buen desarrollo embrionario [27]. Las variaciones no solo se producen entre animales de diferentes razas sino también entre individuos de una misma raza [51, 65]. Esto hace que algunos machos presenten una capacidad fecundante superior a la de otros machos [89]. Es importante destacar que aún cuando pueda darse igualdad entre toros en los resultados de fecundación *in vitro*, existen claras diferencias entre toros en relación al desarrollo posterior de los embriones producidos [40, 89].

Aunque la mejor prueba de la capacidad fecundante de un eyaculado es la obtención de gestación a partir de la inseminación artificial, es difícil en muchos casos realizar inseminaciones artificiales en un número suficiente de hembras, y esto sólo se realiza con toros cuyo valor genético justifica una estimación precisa de su capacidad fecundante. Desafortunadamente, esta no es la situación de las razas extensivas, ya que en muchos casos es imposible realizar pruebas de campo extensas. Por esta razón se ha buscado insistentemente un test de evaluación de capacidad fecundante de los espermatozoides que sirva para predecir esta cualidad de forma real [34]. A lo largo del tiempo se han desarrollado una variedad de pruebas, aunque sólo dos grupos de ensayos han demostrado una correlación aceptable con la fertilidad. A pesar de ello, esta correlación no es constante y es fuente de gran controversia.

El primer grupo de ensayos se basa en métodos que implican la incubación del espermatozoide con el ovocito o alguno de sus componentes (zona pelúcida, o vitelo). Se ha encontrado una relación entre los ensayos *in vitro* y la fertilidad *in vivo* [66], pero no está claro aún si este método serviría para identificar toros de alta fertilidad. El motivo por el que en algunas ocasiones no existe buena correlación entre el test *in vitro* y la fertilidad *in vivo* está relacionado con el hecho de que en muchos casos una menor fertilidad se compensa con un incremento en el número de espermatozoides utilizados [88]. Esto se ve complicado aún más por la variabilidad en la metodología del test de penetración homologa utilizada en diversos laboratorios [65], o las diferencias en los sistemas de capacitación espermática, adaptados a toros en particular, ajustando en cada uno la concentración de agentes inductores de la capacitación, fundamentalmente heparina [87].

Un segundo grupo de pruebas se centran en la evaluación de dos características importantes de los espermatozoides: (a) su morfología y (b) su movilidad. Esta evaluación ha sido tradicionalmente realizada en forma subjetiva

y se ha demostrado en bovinos una relación entre la proporción de espermatozoides normales, espermatozoides con acrosoma intacto, o espermatozoides móviles, y la fertilidad *in vivo* [90, 105]. Sin embargo, existe una limitación muy importante dada por la naturaleza subjetiva de estas evaluaciones. Por este motivo, y con el fin de incrementar el poder predictivo de estas pruebas se han comenzado a utilizar métodos objetivos de evaluación de la morfología y la movilidad espermáticas. Para la morfología se ha desarrollado software de análisis de imagen que de forma manual o automática mide las dimensiones y la forma de los espermatozoides. En cuanto a la movilidad, también se encuentran disponibles una variedad de sistemas de análisis por ordenador de diversos parámetros de movilidad espermática (velocidad progresiva, amplitud del movimiento de cabeza, etc.).

En cuanto a la fertilidad de los sementales utilizados *in vitro* existen numerosos factores de variabilidad, tanto en la tasa de fecundación como en la de producción de blastocistos, empezando por la raza, el animal, e incluso el eyaculado concreto [53]. No obstante, se puede llegar a predecir la capacidad fecundante de un toro mediante repetidos ensayos de FIV. Como se aprecia en el Cuadro 3, pequeñas variaciones en las tasas de no retorno pueden en ocasiones ser determinadas mediante su estudio por FIV ahorrando el gran esfuerzo tanto de tiempo como económico que suponen las pruebas *in vivo* realizadas en base a inseminaciones artificiales.

En aquellos sementales de alto valor zootécnico que presenten una baja fecundidad, esta puede verse incrementada hasta los niveles normales al realizar una fecundación en ambientes de baja concentración de oxígeno (5% O₂), supuestamente debido a la consecuente reducción del posible daño oxidativo originado sobre el esperma [55].

CUADRO 3. DIFERENCIAS ENTRE TOROS AL FECUNDAR *IN VITRO* E *IN VIVO*

Toro	Replicas	Cultivo	División (%)	Desarrollo (%)	Índice Desarrollo	No Retorno (IA)
A	7	1212	891 (73.5) ^a	256 (21.1) ^a	28.7 % ^a	78% (5.300)
B	7	1207	769 (63.7) ^b	170 (14.1) ^b	22.1 % ^b	73% (1.500)
C	7	684	405 (56.2) ^b	84 (12.3) ^b	20.7 % ^b	-
D	7	615	269 (43.7) ^c	30 (4.9) ^c	11.2 % ^c	-

a vs b vs c: P<.001

IV ELECCIÓN DEL SEXO

La capacidad de seleccionar el sexo de las crías en los animales domésticos representa un gran impacto tanto a nivel genético como económico. En el momento actual se desarrollan programas comerciales de TE que incluyen el sexaje de los embriones mediante microbiopsia y utilizando marcadores genéticos que permiten determinar el sexo del futuro individuo, con una fiabilidad cercana al 100% y una fertilidad del 51% [71, 93]. Estas técnicas aunque de uso frecuente en algún país, originan una elevación de los costes que solo esta justificada en determinadas ocasiones, además el embrión biopsiado resulta mas lábil de tal manera que los resultados de gestación resultan ligeramente inferiores y su capacidad para ser conservados en nitrógeno liquido disminuye en comparación con los embriones no manipulados. Estos inconvenientes pueden ser evitados mediante el sexaje del semen y con la producción in vitro de embriones de sexo conocido.

1. SEXADO DEL SEMEN

La separación selectiva de los espermatozoides de acuerdo a ser portadores del cromosoma X o Y, es un área de trabajo muy antigua y de gran controversia en la que no se han conseguido hasta hace relativamente poco tiempo resultados esperanzadores. Basados en la posibilidad de que la membrana plasmática de ambos tipos de espermatozoides fueran antigénicamente diferentes se ha tratado de inactivar los espermatozoides Y con métodos inmunológicos basados en la detección del antígeno H-Y, aunque aún no ha podido demostrarse su efectividad [7, 41]. Entre las técnicas físicas han sido realizados diferentes estudios basados en la hipótesis de distinciones entre ambos tipos de espermatozoides. Así, argumentando una diferente densidad se han utilizado gradientes de Percoll, pero la separación de los espermatozoides no se ha mostrado efectiva [95]. Se han utilizado geles de filtración de Sephadex, pero los resultados iniciales tampoco han sido confirmados posteriormente [60]. Basándose en la teoría de que el espermatozoide Y es mas veloz que el X, la separación por columnas de albúmina está siendo muy utilizada, sobre todo en la clínica humana luego de un extenso estudio clínico sobre 1034 nacimientos, sin embargo al realizar fecundaciones heterólogas (con ovocitos desnudados de hámster), los cariotipos realizados sobre los embriones fertilizados no confirmaron los datos anteriores [8].

Basándose en el hecho de que en el bovino (al igual que en otras muchas especies), el cromosoma X contiene un 3.8% mas de ADN que el cromosoma Y [43], se han desarrollado adaptaciones de las técnicas de citometría de flujo

(inicialmente utilizadas para medir células sanguíneas), mediante las cuales se han podido separar las poblaciones de espermatozoides según el cromosoma sexual que portaran [44]. Esta técnica ha de utilizarse con semen fresco y es capaz de separar poblaciones con una pureza cercana al 90%, aunque su velocidad relativamente baja, del orden de 100 espermatozoides por segundo, imposibilita su utilización en la inseminación artificial estandarizada. No obstante, en un estudio reciente [86], utilizando dosis bajas ($1-2 \times 10^5$ spz/0.1 ml) de espermatozoides sexados y mantenidos en refrigeración (5°C) durante 6-13 h, se obtuvieron un 22.5% (15/67) de partos, alcanzando un 82% de crías del sexo esperado. Los espermatozoides seleccionados por su sexo son utilizados preferentemente en fecundación *in vitro*, donde se ha llegado a obtener un 37% (39/106) de gestaciones provenientes de embriones congelados [15].

2. SEXADO DE LOS EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO*

Los embriones producidos *in vitro* pueden ser sexados con el análisis por PCR de una biopsia blastomérica de igual manera que los producidos *in vivo*, pero los inconvenientes desde el punto de vista aplicativo, se agravan aún más por la labilidad intrínseca de estos embriones [45]. La relación de sexos en los embriones obtenidos *in vivo* es de 1:1 hasta el estado de blastocisto [46], sin embargo ha sido reportado que en los producidos *in vitro* los machos se desarrollan más rápidamente que las hembras, sugiriéndose un efecto del ambiente de cultivo sobre este desarrollo [1, 106]. Así mismo se ha demostrado que los embriones hembras son más susceptibles a inadecuadas condiciones de cultivo y a micromanipulaciones durante su desarrollo, por lo que se aprecia una pérdida preferencial de embriones hembra y por lo tanto un incremento de los machos [26, 30]. Una desproporción de la relación de sexos al nacimiento (más terneros machos) se ha demostrado al cultivar los embriones fecundados *in vitro* en medios de cultivo conteniendo glucosa hasta el estadio de blastocisto [2, 31]. Aunque el mecanismo que explique estas diferencias no es aún conocido, pueden ser obviamente corregidas en los sistemas de cultivo en el caso de desear optimizar el número de embriones totales obtenidos.

El estado de maduración del ovocito al momento de la inseminación puede afectar la proporción de sexos obtenidos después del cultivo *in vitro* [20]. Hasta el momento actual no existe evidencia del mecanismo que explique estas variaciones observadas, no obstante, en nuestro laboratorio, hemos podido estudiar los mecanismos fisiológicos mediante los cuales la relación de sexos podría verse alterada en la fecundación. Hemos encontrado que al inseminar ovocitos inmaduros, a las 16 horas (inmediatamente después de la exclusión del primer cuerpo polar: Grupo 16H) estos son fecundados preferentemente por espermatozoides X (spz-X), mientras que al realizar las inseminaciones

sobre ovocitos maduros , a las 24 h de cultivo (Grupo 24H) resultan fecundados en mayor medida por espermatozoides Y [31], tal como se puede apreciar en los datos mostrados en el Cuadro 4.

Este hecho podría ser explicado por la teoría de que el espermatozoide-Y responde mas deprisa al ambiente de cultivo (esto es a los iones en el presentes), por lo que al inseminar tempranamente muere antes y queda disponible una mayor proporción de espermatozoide-X para el momento en el que el ovocito termine su maduración y está disponible para la fecundación. La diferente habilidad para fecundar de cada tipo de espermatozoides podría estar debida, al menos parcialmente, a diferencias intrínsecas en la actividad fisiológica (movilidad/viabilidad o capacitación/reacción acrosómica) de los espermatozoides antes de la fecundación. Estudios posteriores permitirán ir aclarando estos puntos.

V. OTRAS BIOTECNOLOGIAS. Transgénesis y clonación

Un animal transgénico es aquel que lleva en su genoma moléculas de ADN foráneo introducidas en el laboratorio. El interés inicial en la producción de animales transgénicos fue el de incrementar las características productivas, principalmente la producción de carne, siendo en el cerdo donde primero se llevo a cabo por sus características de corto intervalo generacional y

CUADRO 4. SEXO Y DESARROLLO DURANTE TRES DÍAS DE CULTIVO IN VITRO DE LOS OVOCITOS INSEMINADOS IN VITRO INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE LA EXCLUSIÓN DEL PRIMER CUERPO POLAR (16 H DE MADURACIÓN) Y 8 H DESPUÉS (24H).

	Degenerados	2 - células	4 - células	8 - células	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Grupo 16H	32 (30) ^a	16 (15)	34 (31)	26 (24) ^a	108
Machos/Hembras	11/21	4/12	14/20	12/14	41/67
Relación M/H	0.52	0.33 ^c	0.70	0.86	0.61 ^c
Grupo 24H	11 (11) ^b	14 (15)	30/31	41 (43) ^b	96
Machos/Hembras	5/6	9/5	19/11	27/14	60/36
Relación M/H	0.83	1.80	1.7	1.92 ^d	1.67 ^d

a vs b: P<0.01. c<1 y d>1: P<0.05

gran camada. Para incrementar el crecimiento porcino se trató, entre otras posibilidades, de sobreexpresar la hormona de crecimiento [84] consiguiéndose crecimientos espectaculares, sin embargo los animales producidos padecían efectos indeseables en su crecimiento y su salud. En los últimos años y dado que en los países desarrollados los productos alimenticios son abundantes y relativamente baratos, se buscan los altos beneficios derivados de la manufacturación de los alimentos. Es en la producción de leche donde se encuentra el mayor potencial, con el potencial añadido de la excreción de productos de interés farmacéutico. Otras aplicaciones de gran interés futuro son las derivadas de la modificación de los antígenos de histocompatibilidad animales con el objetivo de su indetección por el organismo humano y con la finalidad de ser utilizados como donantes de órganos para la especie humana.

Modificación de la leche: Las técnicas de ADN recombinante son usadas para alterar los componentes lácteos cualitativa y cuantitativamente: a) para insertar genes reguladores de proteínas para fines médicos y farmacéuticos, y b) para modular la expresión de genes que afectan a los componentes de la leche destinada al consumo humano. Dentro del primer grupo de aplicaciones farmacéuticas los más relevantes resultan la secuencia génica del factor IX anticoagulante humano y el gen α -1- antitripsina para el tratamiento de enfermedades respiratorias [14]. Recientemente se ha descrito la expresión en la glándula mamaria del Factor VIII de coagulación [74]. La purificación de estos agentes terapéuticos excretados en la leche por los animales transgénicos puede llevar a satisfacer la gran demanda mundial de estos compuestos.

Modificación de la leche para el incremento de sus cualidades nutricionales y de la eficiencia en la manufacturación de sus derivados: La ingeniería genética ofrece la posibilidad de producir leche de vaca con alto contenido proteico, leche destinada a la exclusiva producción de queso, helados y yoghurt, leches infantiles de reemplazo, así como a producir cambios en la composición de la grasa láctea para la disminución del contenido graso en la leche producida y el incremento de la relación de ácidos grasos insaturados [29].

La composición de la leche en proteínas está bien estudiada y su división en proteínas coagulables (que pasan a formar parte de queso) y no coagulables tiene una incidencia económica clara en la producción de queso. Parte de las proteínas de la leche (lactoalbúminas) se pierden con el suero obtenido en el prensado de la cuajada y solo puede recuperarse produciendo requesón, lo que encarece el proceso. Otra parte de las proteínas (caseínas) pasan a formar parte del entramado de caseinatos que retienen la grasa en la coagulación o formación de la cuajada y quedan en el producto final. El elevado rendimiento lechero que presenta la leche de vaca viene determinado por la composición en las caseínas α_1 , α_2 , β y κ con sus variantes genéticas a y b. Aunque no

todas tienen la misma capacidad para coagular y retener los componentes de la leche, y así la presencia de exceso de caseína resulta en un incremento significativo en la dureza del cuajo y en una menor talla del micelio [32].

De todos los marcadores genéticos usados, se ha demostrado una fuerte asociación entre los polimorfismos alélicos encontrados en los genes de la leche kappa-caseína (KCN) y beta-lactoglobulina (BLG), tanto para el porcentaje de proteína en leche como para las aptitudes tecnológicas en la producción de queso. La beta-lactoglobulina (BLG) es la proteína del suero más abundante y presenta dos variantes genéticas comunes la BLG-A y la BLG-B. La leche procedente de animales con el alelo A de la BLG tiene mayor producción y porcentaje de proteína total. La existencia de los alelos B de la KCN y de la BLG se han asociado con una alta concentración de caseínas, con una menor concentración de proteínas del suero y con la formación de un coágulo más firme debido a una mayor producción y retención de caseínas en los procesos de coagulación; al producirse unas micelas de muy pequeño tamaño en la leche dará lugar a un menor tiempo de acción de la renina (o quimosina) durante los procesos de coagulación [35, 63]. De igual manera se describe un incremento del 2% en la producción de queso [64].

Este apartado ha recibido una atención menor que el farmacológico, aunque desde el punto de vista de la producción animal resulta más interesante por repercutir más directamente sobre los beneficios de las explotaciones, pues la transformación de la leche de vaca en queso es uno de los métodos que tienen los ganaderos para participar más en el valor añadido y para mejorar sus rentas sin necesidad de aumentar el número de cabezas o las producciones. Sin embargo, la industria láctea no se ha mostrado muy interesada aun en la modificación de la composición de la leche de vaca, posiblemente por las onerosas transformaciones industriales que les acarrearía. Así mismo hay que tener en cuenta que en la actualidad para obtener una vaca transgénica se requiere microinyectar un promedio de 1.600 óvulos [98], y que solo el 50% de las crías transgénicas expresarán el transgene, por lo cual el rendimiento de las técnicas resulta muy bajo.

La generación en el laboratorio de animales genéticamente idénticos se inició en Cambridge al comienzo de la década de los 80 [102], en base a la partición por microcirugía de los embriones obtenidos en fase de mórula o blastocisto. Por medio de esta técnica se puede aumentar la eficiencia de un individuo de élite o un factor determinado y así optimizar los programas de mejora. El rendimiento de la técnica al partir de embriones de buena calidad se sitúa en el 80% de supervivencia y el 25% de gestaciones gemelares, siendo necesario dividir 3-4 embriones para conseguir un par de mellizos idénticos [9]. Esta tecnología fue incorporada a los programas de mejora de vacuno de leche con buenos resultados [47], alcanzando unas tasas de gestación entre el

50 al 60% [92], aunque en las explotaciones de ganado extensivo se plantea el problema de los partos dobles con los problemas de manejo que conlleva. No obstante, los resultados obtenidos sobre receptoras criollas alcanzan niveles del 53% de gestación y 22% de partos gemelares [80].

Hace más de una década que se consiguió la multiplicación embrionaria mediante la fusión de una célula embrionaria donante con un citoplasma receptor proveniente de un óvulo enucleado [101] y desde entonces han sido numerosos los esfuerzos realizados en esta área, ya que existen muchos factores que influyen en la eficiencia de este tipo de clonación, de tal manera que la proporción de embriones reconstituidos que son capaces de desarrollarse a término no sobrepasa el 5% [103]. Al margen de la gran importancia que representa el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la reprogramación de la expresión génica, la aplicabilidad de estas técnicas resultaba dudosa hasta el punto de que diferentes compañías comerciales clausuraron su actividad al inicio de la presente década. Sin embargo, muy recientemente se ha reabierto este campo al demostrarse la posibilidad de obtener individuos idénticos a partir de células adultas en fase G0/G1, inicialmente a partir de células cultivadas procedentes de la glándula mamaria [104] y de células sin cultivar del cumulus ooforus folicular [97], introducidas en ovocitos enucleados que son capaces de originar nuevos individuos clónicos. Así pues, la clonación de individuos adultos de fenotipo conocido ofrece grandes posibilidades en el campo aplicativo, sobre todo al permitir optimizar los resultados actuales multiplicando el reducido número de animales transgénicos disponibles hasta niveles comercialmente aceptables.

VI. ACTIVIDAD ACTUAL EN EUROPA

Durante los últimos cuatro años la actividad desarrollada en Europa en TE se ha ido incrementando lentamente (Cuadro 5), manteniéndose en segundo lugar mundial (detrás de Norteamérica). Los datos son referidos por 19 países europeos. En el año 1994 las superovulaciones realizadas lo fueron sobre el 64% de los animales de producción láctea y el 36% de carne, aunque muy probablemente se estén equiparando en la actualidad.

Los promedios de embriones obtenidos por animal superovulado están cercanos a nueve, de los cuales cinco son transferibles (58-61%). Más de 100.000 embriones son transferidos por año y aproximadamente la mitad de ellos son congelados-descongelados, en 1997 el 53.5%.

En los últimos dos años la Asociación Europea de Transferencia de Embriones (AETE) recopila también las estadísticas relativas a la producción *in vitro* de embriones bovinos, la cual ya representa el 5.8% (7.952 embriones) y

CUADRO 5. ACTIVIDAD EUROPEA EN TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

	Colectas	Emb. Tot	Prom.	Emb. Viab	Prom.	% Viab.	TE
1994	22.557	194.589	8.6	115.718	5.1	59%	102.887
1995	25.032	215.046	8.6	125.599	5.0	58%	112.531
1996	24.133	214.323	8.9	129.095	5.3	60%	111.321
1997	26.974	235.586	8.7	145.032	5.4	61%	118.550

De: AETE Statistics 1995-1998.

el 7.3% (11.443) de los embriones producidos, de los cuales se transfirieron el 5.6% (6.621) y el 6.5% (7.748) [38, 39].

De las estadísticas anteriormente expuestas se puede apreciar un claro incremento en la producción de animales generados *in vitro*, no obstante, hay que tener en cuenta que las gestaciones obtenidas de los embriones producidos *in vivo* son superiores a las de los embriones-FIV (50-70% vs 40-50%), bajando hasta el 10-40% las obtenidas de embriones congelados-descongelados, siendo superiores en el inicio de la gestación (antes del día 23) pero también después de los 2 meses (7-24%) [25, 36, 52].

Estas pérdidas en gestación de los embriones-FIV unidas al incremento de defectos congénitos (3-5% vs 0.6-2% en IA), incremento del peso al nacimiento (10% >IA) y por lo tanto distocias y muertes perinatales (9-14% vs 6%IA/TE) [21, 48, 70]; representan los factores limitantes para la expansión zootécnica de estas tecnologías. Estos problemas provienen de la manipulación *in vitro* de los gametos, dado que existen grandes diferencias en los resultados obtenidos por diferentes laboratorios [48], por lo que en el futuro cercano han de ser numerosos los trabajos a realizar para tratar de eliminar estas limitaciones.

VII. LITERATURA CITADA

- [1] Avery B, Jorgensen CB, Madison V and Greve T. Morphological development and sex of bovine *in vitro* fertilized embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 256-270. 1992.
- [2] Behoodi E, Gutierrez-Adan A, and Anderson GB. Inadvertent sex selection in a protocol of *in vitro* bovine embryo production. *Theriogenology* 47: 265. 1997.
- [3] Bergfelt DR, Lighfoot KC, Adams GP. Ovarian synchronization following ultrasound-guided follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 42: 895-907. 1994.

- [4] Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard, MA. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 47: 1061-1075. 1997.
- [5] Brackett BG, Keskinetepe I. Aspects of bovine oocyte maturation and embryo production in vitro. 7^ª Jornadas Intern. Reprod. Animal. Murcia, España, 27-30. 1994.
- [6] Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27: 147-158. 1982.
- [7] Bradley MP. Immunological sexing of mammalian semen: Current status and future options. *J. Dairy Sci.* 72: 3372-80. 1989.
- [8] Brandriff BF, Gordon LA, Singer S, Moore DH and Glendhill BL. Sex chromosome ratios determined by karyotypic analysis in albumin isolated human sperm. *Fertility and Sterility* 46: 678-685. 1986.
- [9] Brem G. Micromanipulación en embriones bovinos y su aplicación en mejoramiento animal. Hemisferio Sur. Argentina, 209 pp. 1986.
- [10] Broadbent PJ, Dolman DF, Watt RG, Smith AK, Franklin MF. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. *Theriogenology* 47: 1027-1040. 1997.
- [11] Brogliatti GM and Adams GP. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology* 43: 177. 1994.
- [12] Brogliatti GM. Ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration in prepubertal calves. PhD Thesis. Univ. Saskatchewan. Canada. 78pp. 1996.
- [13] Brogliatti GM, De la Fuente J, Bergfelt DR and Adams. Ovarian dynamics subsequent to ultrasound-guided follicle ablation in prepubertal calves. 11th Sci. Meeting AETE. 138 Abstr. 1995.
- [14] Clark AJ, Bessos H, Bishop JO, Brown P, Lathe R, McClenaghan M, Prowse C, Simons JP, Whitelaw CBA and Wilmut Y. Expression of human anti-hemophilic factor IX in milk of transgenic sheep. *Biotechnology* 7:487-492. 1989.
- [15] Cran J. Sex preselection cattle: a field trial. *Vet. Rec.* 136: 496-496. 1995.
- [16] De la Fuente J, Anel L, Sevillano C, Boixo JC, Anel E. Obtención continuada de ovocitos sobre terneras impubescentes. Proc. IV Congreso Internacional de Medicina Bovina Gijón (España), 122. 1986.
- [17] De la Fuente J, Fuentes S and Ugarte C. Pregnancy rates of one-step thawed MOET embryos. 11nd Meeting AETE Hannover, 154. 1995.
- [18] De la Fuente J y Granados J. Effect of three different culture media on IVF bovine embryos. 12nd meeting AETE Lyon, 124. 1996.
- [19] De la Fuente J y Granados J. Resultados preliminares de congelación de embriones bovinos producidos in vitro. VII Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza, España Tomo II, 544-546. 1997.
- [20] Dominko T and First NL. Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. *Theriogenology* 47: 1041-1050. 1997.

- [21] Farin PW, Farin CE. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: Survival and fetal development. *Biol Reprod* 52, 676-682. 1995.
- [22] Fry RC, Niall EM, Simpson TL, Squires TJ, Reynolds J. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 47: 977-987. 1997.
- [23] Fuentes S and De la Fuente J. Different synchronization treatments for direct embryo transfer to recipients heifers. 13rd Meeting AETE Lyon, 148. 1997.
- [24] Fuentes S, Ugarte C y De la Fuente J. Resultados reproductivos y genéticos del Programa MOET en ganado Holstein en el País Vasco. 1^{er} Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Estoril. 147-153. 1997.
- [25] Galli C and Lazzari G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 371-379. 1996.
- [26] Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Effect of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 2: 405-419. 1994.
- [27] Gordon I and Lu, KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33: 77-87. 1990.
- [28] Greve T, Madison V. In vitro fertilization in cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 31: 147-157. 1991.
- [29] Gutierrez-Adán A and Pintado B. The use of transgenic techniques in farm animals: Outlook on altering milk composition. *AETE Newsletter* 7: 5-9. 1997.
- [30] Gutierrez-Adan A, De la Fuente J, Fuentes S Payas A, Ugarte C and Pintado B. Influence of biopsy sexing and in vitro culture on losses of female mouse and bovine embryos. *Animal Biotechnology*, 6(2) 101-109. 1995.
- [31] Gutierrez-Adan A, Granados J, Pintado B and De la Fuente J. Influence of the glucose on the sex ratio of bovine IVM-IVF embryos cultured in vitro. 14th Meeting AETE Venice, 166. 1998a.
- [32] Gutierrez-Adan A, Maga EA, Meade HM, Schoemaker CF, Medrano JF, Anderson GB and Murray JD. Alterations of physical characteristics of milk from transgenic mice producing bovine -casein. *J. Dairy Sci.* 79, 791-799. 1996.
- [33] Gutierrez-Adán A, Perez-Garnelo S, Granados J, Garde JJ, Perez-Guzman M, Pintado B and De la Fuente J. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturation state of oocyte. Zygote. (in press). 1998b.
- [34] Hammerstedt RH. Evaluation of semen quality: Identification of the subfertile male and course of action. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 77-87. 1996.
- [35] Hartung, H. and Gernand, E. Investigación about cheese yielding capacity in relation to casein-polymorphisms. *Arch. Tierz. Dummerstorf* 40:305-308. 1997.
- [36] Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Mc Cauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 3: 141-152. 1995.
- [37] Hawk HA, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in-vitro produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41, 1571-1583. 1994.

- [38] Heyman I. Overall bovine embryo transfer activity in Europe in 1997. 13th Meet. AETE, Lyon. France. pp 67. 1997.
- [39] Heyman I. Overall bovine embryo transfer activity in Europe in 1998. 14^a Meet. AETE, Venice, Italie, pp 61. 1998.
- [40] Hillery FL, Parrish JJ, First NL. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology* 33: 249. 1990.
- [41] Howes R. A research for sex specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome bearing sperm populations separated by fluorescence activated cell sorting. *J. Reprod. Fert.* 110: 195-204. 1997.
- [42] IETS Manual 1990, Stringfellow and Seidel. Ed., 79 pp. 1990.
- [43] Johnson LA and Clarke RN. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm: Activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes. *Gamete Research* 21: 335-343. 1990.
- [44] Johnson LA. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: A review. *Reprod. Fertil. Dev* 7: 893-903. 1995.
- [45] King WA, Picard L, Bousquet D and Goff AK. Sex dependent loss of bisected bovine morula after culture and freezing. *J. Reprod. Fertil.* 96: 453-459. 1992.
- [46] King WA, Yadar BR, Xu KP, Picard L, Sirard MA and Betteridge KJ. The sex ratio of bovine embryos produced in vitro and in vivo. *Theriogenology* 36: 779-788. 1991.
- [47] Kippax IS, Christie WB and Rowan TG. Effects of methods of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology*, 35: 25-35. 1991.
- [48] Kruip AM and den Daas JHG. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47: 43-52. 1997.
- [49] Kruip AM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pietersen MC. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding cattle. *Theriogenology* 42: 675-684. 1994.
- [50] Kuwayama M, Hamano S, Nagai T. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fert* 96: 187-193. 1992.
- [51] Lancaster R, Catt J, Rhodes S, Polge C. Bull and Breed Specific Effects of Heparin-Capacitated Bovine Sperm on In vitro Fertilization of In Vitro Matured Follicular Oocytes. 6th Reunion of the EETS, Lyon Francia, pag 166. 1990.
- [52] Lane MW, Aherns TJ, Lewis MI, Gardner DK and Peura TT. Cryopreservation and direct transfer of in vitro produced bovine embryos: a comparison between vitrification and slow-freezing. *Theriogenology* 49: 170. 1998.
- [53] Lazzari G and Galli C. In vitro embryo production and its application to cattle breeding. 12nd Meeting AETE Lyon, 7384. 1996.

- [54] Lazzari G and Galli C. Salvage of valuable germplasm of sterile cattle by in vitro technologies. 9th Sci. Meeting AETE. Pp 87-99. 1993.
- [55] Lazzari G, Crotti G, Duchi R, Notari C and Galli C. Lowering the oxygen level during IVF improves the fertilizing ability of bovine sperm and does not affect the developmental capacity of the embryos obtained. 14th Meeting AETE Venice, 198. 1998.
- [56] Le Gal F and Massip A. In vitro fertilization and developmental abilities of bovine oocytes after exposure to vitrification solutions or vitrification at different stages of their maturation process. 34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology. 136 Abst. 1997.
- [57] Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39: 81-94. 1993.
- [58] Lenz S, Lauritzen JG. Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anesthesia. *Fertil Steril* 38: 673. 1982.
- [59] Lenz S, Lindenberg S, Fehilly C, Pietersen K. Are ultrasonic-guided follicular aspiration and flushing safe for the oocyte? *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 4: 159-161. 1987.
- [60] Lobel SM, Pomponio RJ and Mutter GL. The sex ratio of normal and manipulated human sperm quantitated by the PCR. *Fertil and Steril* 59: 387-92. 1993.
- [61] Lohuis MM. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43: 51-60. 1995.
- [62] Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41: 67-72. 1994.
- [63] Losi, G., Capella, P., Castagnetti, GB., Grazia. L., Zambonelli, C., Mariani, P, Russo, V. Influenza delle varianti genetiche della caseina K sulla formazione e sulle caratteristiche della cagliata. *Sci. Tecnol. Alim* 3: 373-376. 1973.
- [64] Lunden, A. Nilsson. M y Janson, L. Market effect of B-lactoglobulin polymorphism on the ration of casein to total protein in milk. *J. Dairy Sci.* 80: 2996-3005. 1997.
- [65] Marquant-Le Guienne B, Humblot P. Evaluation of bull semen fertility by homologous fertilization tests. 7as Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Murcia, España, pag 93-100. 1994.
- [66] Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M, Thibault C. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev.* 30: 259-266. 1990.
- [67] Martino A, Leibo SP. Crioconservación de ovocitos bovinos para su utilización en FIV. VII Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza, España Tomo II, 547-549. 1997.
- [68] Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced embryos: implications for their conservation. *Hum Reprod* 10: 3004-3011. 1995.

- [69] Massip, Mermillod P, Wils C, Dessy F. Effect of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced in vitro. *J Reprod Fert* 97: 65-69. 1993.
- [70] Merton S, van Wagtendonk-de Leeuw AM and den Daas JHG. Factors affecting birthweight of IVP calves. *Theriogenology* 49: 293. 1998.
- [71] Nibart M, Morel A, Durand M, Guerin B and Humblot P. Pregnancy rates and accuracy of sexing after transfer of frozen biopsied bovine embryos. 14nd Meeting AETE Venice, 218. 1998.
- [72] Nicholas T. y Smith R. Increased rate of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 26: 341. 1983.
- [73] Niemann H. *Theriogenology* 23: 631. 1985.
- [74] Niemann H, Halter R, Carnwath JW, Herrmann D, Lemme E and Paul D. Expression of humancotting factor VIII cDNA construct in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic animals in Agriculture. Conference, Tahoe City, CA, USA, p:48. 1997.*
- [75] Niemann H. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived in vitro and in vivo. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, 24 (supl.) 67-77. 1996.*
- [76] Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki T. Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation in vitro and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen matured oocytes. *Theriogenology* 38, 711-719. 1992.
- [77] Otter T, Flapper HW, Kaal LMTE and van Wagtendonk-de Leeuw AM. Pregnancy rates of bovine embryo frozen in 1.5M ethylene glycol: a comparison between direct transfer vs transfer after a one-step dilution. 14nd Meeting AETE Venice, 222. 1998.
- [78] Palasz A, Thundathil J, De la Fuente J and Mapletoft RJ. Equilibrium freezing of mouse morulae and in vitro-produced blastocyst in 5% glycerol and biological or synthetic macromolecules. 34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology. 134 Abst. 1997.
- [79] Palasz A, Tornesi MB, Archer J and and Mapletoft RJ. Media alternatives for collection culture and freezing of mouse and cattle embryos. *Theriogenology* 44: 705-714. 1995.
- [80] Palma G, Alberio R and Brem G. Moderne reproduktions-techniken in der extensiven Tierhaltung in Argentinien. En: *Forstschritte in der Tierzuchtung. Deutsch. G. Brem (eds). Elmer. 381-409. 1991.*
- [81] Pietersen MC, Kappen RA, Kruip AM, Taverne MAM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762. 1988.
- [82] Pietersen MC, Vos PLAM, Kruip AM, Wurth YA, van BenedenTh H, Willemse AH, Taverne MAM. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35: 857-862. 1991.
- [83] Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41: 101-106. 1994.
- [84] Pursel VG and Rexroad CE. Recent progress in the transgenic modification of swine and sheep. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 251-254. 1993.

- [85] Reichenbach HD, Wiebke NH, Besenfelder UH, Modl J, Brem G. Transvaginal laparoscopic guided aspiration of bovine follicular oocytes: preliminary results. *Theriogenology* 39: 295 abstr. 1993.
- [86] Seidel GE, Allen CH, Johnson LA, Holland MD, Brink Z, Welch GR, Graham JK and Cattell MB. Uterine horn insemination of heifers with low numbers of non-frozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology* 48: 1255-1264. 1997.
- [87] Shamsuddin M, Niwa K, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. In vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 613-622. 1996.
- [88] Shannon P, Vishwanath R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim. Reprod. Sci.* 39: 1-10. 1995.
- [89] Shi DS, Lu KH, Gordon I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology* 33: 324. 1990.
- [90] Soderquist L, Larsson K, Einarsson S. Sperm morphology and fertility in A.I. bulls. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 38: 534-543. 1991.
- [91] Stingfellow DA, Wrathall AE. Epidemiological implications of the production and transfer of IVF embryos. *Theriogenology* 43: 89-96. 1995.
- [92] Takeda T, Hallowell SV and Hasler JF. Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and nonsurgically. *Theriogenology* 25: 204. 1986.
- [93] Thibier M and Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43: 71-80. 1995.
- [94] Trouson A, Pushett D, NacLellan LJ, Lewis I, Gardner DK. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology* 41: 57-66. 1994.
- [95] Upreti GC, Riches PC and Johnson LA. Attempted sexing of bovine spermatozoa by fractionation on a percoll density gradient. *Gamete Research* 20: 83-922. 1988.
- [96] Van der Schans A, van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, Eyestone WH, de Boer HA. Ultrasound guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 35: 288 abstr. 1991.
- [97] Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-373. 1998.
- [98] Wall RJ. Modification of milk composition in transgenic animals. En: Miller RH (ed). *Biotechnology's role in the genetic improvement of farm animals*. Beltsville Symposium XX, p.165-188. 1996.
- [99] Watersone JW, Parson JH. A prospective study to investigate the value of flushing follicles during transvaginal ultrasound-directed follicle aspiration. *Fertil and Steril.* 57: 221-223. 1992.
- [100] Wikland M, Nilsson L, Hansson R, Hamberger L, Janson PO. Collection of human oocytes by the use of sonography. *Fertil and Steril.* 38: 603-608. 1983.
- [101] Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320: 63-65. 1986.

- [102] Willadsen SM. Micromanipulation of embryos of the large domestic species. En: *Mammalian Egg Transfer*. Florida: CRC Press. 185-210. 1981.
- [103] Wilmut I and Campbell KHS. Embryo multiplication in livestock: present procedures and the potential for improvement. En: *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*. Lauria A & Gandolfi F. (eds). Portland Press: 135-147. 1992.
- [104] Wilmut I, Schinieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813. 1997.
- [105] Wood PDP, Foulkes JA, Shaw RC, Melrose DR. Semen assessment, fertility and the selection of Hereford bulls for use in AI. *J. Reprod. Fert.* 76, 783-795. 1986.
- [106] Xu KP, Yadav BR, King WA and Betteridge KJ. Sex related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 249-252. 1992.
- [107] Yang NS, Lu KH, Gordon I. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of Bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology* 30: 352. 1990.
- [108] Zimmer EZ, Timor-Tritsch IE, Rottem S. The technique of transvaginal sonography. En: Timor-Tritsch I. and Rottem S. *Transvaginal ultrasonography*. 2nd edition. Elsevier Science Publishing Co. 61-75. 1991.