

# Producción y Transferencia de Embriones en bovinos: viejos y nuevos desafíos para una herramienta clave en los programas reproductivos.

Dr. Sergio Kmaid, DMV

skmaid@gmail.com

## RESUMEN

La transferencia de embriones es utilizada en Uruguay desde hace más de 40 años. El crecimiento del número de embriones producidos In Vitro (IVP) ha acompañado el panorama mundial, desplazando la producción de embriones por superovulación (IVD). Diversos factores afectan las tasas de preñez, tanto para embriones IVP, como para IVD, frescos o congelados. Se presentan los datos de más de 7.800 transferencias y la influencia de algunos factores tales como la calidad del embrión, el origen (IVP vs IVD, frescos o congelados), el operador, la facilidad en la transferencia y el sitio de deposición del embrión, así como la utilización de antiinflamatorios no esteroides (AINEs) al momento de la transferencia. Las tasas de preñez obtenidas para embriones frescos IVD fueron 62,3% y 46,2% para embriones calidad 1 y 2 respectivamente. Para embriones congelados IVD fueron 55,2% vs 44,3% para calidad 1 y 2 respectivamente y para embriones IVP frescos, 41,9% vs 34,2%, para embriones de calidad 1 y 2 respectivamente. La utilización de antiinflamatorios no esteroides (Ac. Tolfenámico) a pesar de que las tendencias numéricas mostraron resultados prometedores no resultó en diferencias significativas en las tasas de preñez: 56,7% vs 54,9% para el grupo tratado vs el control.

## SUMMARY

Embryo transfer has been used in Uruguay for more than 40 years. The growth in the number of embryos produced in vitro (IVP) has accompanied the global panorama, displacing the production of embryos by superovulation (IVD). Several factors affect pregnancy rates for both IVP and IVD embryos, fresh or frozen. Data from more than 7,800 transfers and the influence of some factors such as embryo quality, origin (IVP vs IVD, fresh or frozen), operator, ease of transfer and site of embryo deposition, as well as the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs

(NSAIDs) at the time of transfer are presented. The pregnancy rates obtained for fresh IVD embryos were 62.3% and 46.2% for quality 1 and 2 embryos respectively. For frozen embryos IVD were 55.2% vs 44.3% for quality 1 and 2 respectively and for fresh IVP embryos, 41.9% vs 34.2%, for quality 1 and 2 embryos respectively. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Ac. Tolfenamic) although the numerical trends showed promising results did not result in significant differences in pregnancy rates: 56.7% vs 54.9% for the treated vs. control group.

## INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) ocupa un lugar clave en el desarrollo de los programas reproductivos y de mejora genética en los bovinos. A pesar de que la inseminación artificial permanece como la tecnología que más ha impactado en el avance genético de la ganadería (43), la influencia de los programas de transferencia de embriones sobre la industria de la inseminación artificial, fundamentalmente en las razas de producción lechera, es determinante (38). Con la incorporación de la selección genómica en razas de carne, la TE también está influenciando la selección de toros en los centros de inseminación artificial (26) En Uruguay esta tecnología está disponible desde los años 80 (M. Algorta, comunicación personal). En 1994 se comunica el nacimiento del primer ternero producido por Fertilización In Vitro (21) y a partir del año 2004 la producción de embriones In Vitro también es parte del portafolio de opciones tecnológicas de los productores ganaderos (L. Gianola y S. Secco, comunicación personal) Desde entonces, la producción de embriones por superovulación o por cultivo in vitro es utilizada de forma rutinaria por los criadores en nuestro país. A pesar de los avances en la tecnología, los resultados obtenidos a partir de la transferencia de embriones producidos tanto In Vivo (IVD) como In Vitro (IVP) son variables. Existen algunas estrategias para mejorar las tasas

de preñez en receptoras de embriones, tales como el uso de antiinflamatorios no esteroides (AINEs) que podrían ser una alternativa para mejorar estos resultados (4,17)

Este trabajo tiene como objetivos destacar algunos factores que influyen sobre el resultado de un programa de TE con embriones producidos In Vivo o In Vitro, frescos o congelados y comentar algunas alternativas disponibles, como la utilización de AINEs para mejorar las tasas de preñez.

### Evolución de los sistemas de producción de embriones bovinos

Tradicionalmente, la producción de embriones en el bovino ha dependido de programas de ovulación múltiple y transferencia (22), sin embargo, desde los años 2000, la producción de embriones por aspiración transvaginal (OPU) y fertilización in vitro de los ovocitos ha

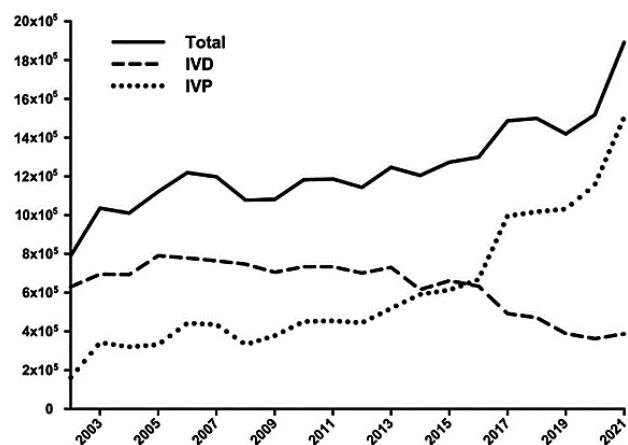


Figura 1. Número de embriones bovinos [Producidos in vivo (IVD), producidos in vitro (PIV) y totales] registrados en el período 2002-2021 a nivel mundial, según año (16).

tenido un incremento sustancial a nivel mundial (16). Esta evolución se ha producido por numerosos factores, entre ellos, la variación de las respuestas a la superovulación (SPO), los factores asociados al manejo de las donantes y los protocolos de SPO (14) así como la evolución de la tecnología de producción de embriones In Vitro (PIV) y aspiración folicular (28,29). Es interesante reseñar la evolución de estas cifras de acuerdo con la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (16).

En el Uruguay se ha producido una evolución similar, siendo la mayoría de los embriones transferidos en la actualidad, producidos In Vitro. En promedio, se han registrado unos 2.500 animales nacidos por transferencia embrionaria (machos y hembras) por año, desde el año 2015, siendo Aberdeen Angus, la raza con mayor número de registros (Asociación Rural, Registros Genealógicos, A. Garmendia y G. Vergara, comunicación personal).

### Marco de referencia en Uruguay

Desde el año 1997, hemos transferido en torno a 10.000 embriones producidos In Vivo (IVD) o In Vitro (IVP), frescos o congelados, de los cuales se tienen registros detallados en 7.825 transferencias.

### Desarrollo del trabajo

#### Producción de embriones por superovulación

Las donantes fueron superovuladas de acuerdo con procedimientos ya descritos (22). Fue utilizada FSH de origen porcino: Folltropin (Vetoquinol, Canadá), Pluset (Laboratorios Calier, España) o Stimufol (Reprobiol, Bélgica) en dosis decrecientes o iguales durante 4 días,

Tabla 1. Número de animales nacidos por TE por año y raza registrados en ARU.

RAZA	Año 2015	Año 2016	Año 2017	Año 2018	Año 2019	Año 2020	Año 2021	Año 2022
A. Angus	1.232	2.019	1.762	1.784	1.430	1.437	1.650	1.721
Brangus	167	154	122	191	89	167	173	506
Hereford	357	548	440	497	487	537	292	495
Wagyu	15	0	16	12	45	50	19	163
Braford	57	43	79	116	62	102	62	115
Senepol	25	10	1	6	5	5	19	31
Holando	187	137	56	74	49	17	38	14
Normando	8	0	0	6	1	0	0	14
Simmental	3	82	0	0	0	0	0	9
Jersey	3	0	4	6	0	0	1	8
Red Poll	0	0	0	0	0	0	0	6
Shorton	0	7	17	48	24	0	2	1
B. Galloway	0	0	0	9	0	0	0	0
Pardo Suizo	0	0	0	0	0	13	0	0
<b>Total</b>	<b>2.054</b>	<b>3.002</b>	<b>2.497</b>	<b>2.749</b>	<b>2.197</b>	<b>2.335</b>	<b>2.267</b>	<b>3.113</b>

después del celo o la colocación de un dispositivo intra-vaginal más benzoato de estradiol (día 0). El día 8, 2 inseminaciones con un intervalo de 8-12 horas, utilizando entre 1 y 3 dosis de semen por inseminación. La colecta se realizó entre 6 y 8 días post celo, introduciendo el medio de colecta (PBS o Ringer Lactato) mediante gravedad por sistema cerrado y recogido en un filtro tipo Emcon. Los embriones fueron examinados en un microscopio estereoscópico (10x-50x) y clasificados de acuerdo con lo establecido por la IETS. Se consideran transferibles los embriones clasificados como 1, 2 y 3. Los embriones seleccionados, se cargaron en pajuelas de 0,25 mL con PBS adicionada de antibióticos y albúmina bovina y fueron transferidos entre 0 y 6 horas post colecta. Los embriones viables no transferidos fueron congelados en medio de Etilenglicol 1.5 M en PBS adicionado de albúmina bovina, antibióticos y sacarosa, entre 1 y 4 horas de colectados. Fueron congelados únicamente embriones clasificados como 1 o 2. Fue utilizada una congeladora programable (Freeze Control 5500, Cryologic, Australia) Los embriones se equilibraron por 10 minutos a temperatura ambiente o a  $-6.5^{\circ}\text{C}$  y se mantuvieron por 10 minutos a  $-6.5^{\circ}\text{C}$ . Después de 2 minutos de equilibrio en esta temperatura, fue realizado el seeding mediante un algodón embebido en nitrógeno líquido. La curva de descenso de temperatura fue de  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ , desde  $-6,5^{\circ}\text{C}$  a  $-32^{\circ}\text{C}$ . Al alcanzar esta temperatura fueron sumergidos en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) y envasados en rieles con la correspondiente identificación.

### Producción de embriones In Vitro

Los embriones fueron producidos por dos laboratorios diferentes (Quiniman SA y Origen). Brevemente se describen los procedimientos utilizados, comunes a ambos laboratorios. Los ovocitos fueron obtenidos de las donantes sin estimulación hormonal previa, por aspiración folicular utilizando un ultrasonido en modo B en tiempo real con transductor convexo de 7,5 MHz instalado en el dispositivo intravaginal y una guía de acero inoxidable. La punción folicular se realizó con una aguja calibre 19 mm conectada a un tubo cónico de 50 mL a través de

un tubo de silicona. La aspiración fue realizada utilizando una bomba de vacío con presión negativa. El material aspirado se filtró inmediatamente a través de un filtro EmCon con solución salina tamponada con fosfato (PBS) Los complejos de ovocitos cúmulos fueron clasificados de acuerdo con las células del cúmulo. Los COCs fueron cultivados en por 24 h en gotas de medio de maduración bajo aceite mineral a  $39^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ . Para la fertilización In Vitro fue utilizado semen de 1 o 2 pajuelas. El semen fue lavado y centrifugado a través de un gradiente de Percoll. Los espermatozoides se capacitaron utilizando heparina. La concentración de espermatozoides fue ajustada y cada gota de fertilización recibió una dosis fecundante adecuada. Después del periodo de maduración, los COCs fueron acondicionados para ser transferidos a las gotas de fertilización. Después de la FIV, los ovocitos y las células cúmulos se transfirieron a las gotas de medio de cultivo para embriones, permaneciendo en este medio 8 días bajo las mismas condiciones de temperatura y atmósfera descritas. Una vez extraídos del cultivo, fueron cargados en pajuelas de 0.25 mL y mantenidas en un contenedor isotérmico a  $38^{\circ}\text{C}$  hasta su transferencia, entre 2 y 8 horas de haber sido extraídos del cultivo.

### Procedimientos para la transferencia de embriones

La transferencia de embriones involucra una serie de etapas y procedimientos, que son compartidos, independientemente del origen y estado de los (IVD, IVP, fresco o congelado):

1. Selección de las receptoras y plan sanitario previo a la transferencia.
2. Programa de Sincronización. con doble inyección de Prostaglandina, separadas 11-14 días y detección de celos, mediante ayudas visuales como parches, crayola o pintura.
3. Los embriones son transferidos a receptoras entre 6 y 8 días post celo.
4. Aplicación de anestesia epidural (Lidocaína al 2%, 4-6 mL por animal) y eventualmente un tranquilizante, Acepromazina (0,2 a 0,8 mL/100 kg)

**Tabla 2.** Embriones transferidos según sistema de producción (IVD o IVP) y estado (Frescos o congelados)

Tipo de Embrión	Transferidos
IVD Fresco	3,294
IVD Congelado	2,312
IVP Fresco	2,160
IVP Congelado	59
Total	7,825

**Tabla 3.** Porcentaje de los embriones transferidos según raza

Raza	%	Raza	%
A. Angus	42.2	Murray Grey	0.6
Holando	35.7	Normando	0.6
Hereford	12.2	Shorthorn	0.6
Wagyu	4.8	Red Poll	0.4
Brangus	1.4	Braford	0.4
Jersey	0.8	Bonsmara	0.2

5. Evaluación y determinación del Cuerpo Lúteo.
6. Embriones congelados IVD: la pajuela se extrae del termo de nitrógeno, se deja al aire 5 segundos y se coloca en baño María a 28-35°C de acuerdo con las condiciones establecidas por el técnico que congeló los embriones. Se secan y montan en el aplicador más camisa sanitaria.
7. Embriones IVP: se extraen del termo de transporte (mantenidos entre 37-38°C) y se montan en el aplicador más camisa sanitaria.
8. Embriones IVD frescos: se cargan en pajuelas de 0.25 mL y se montan en el aplicador más camisa sanitaria.
9. Transferencia ipsilateral al cuerpo lúteo.
10. Diagnóstico de gestación por palpación rectal o ecografía (entre 30 y 60 días post celo de las receptoras)

## Factores que influyen en las tasas de concepción de los embriones transferidos.

Las tasas de concepción son influenciadas por diversos factores relacionados con el embrión tales como el estadio de desarrollo embrionario y su calidad (9), origen (in Vivo vs In Vitro) (12,29) y estado (congelado vs fresco) Otros factores más sutiles, tales como el toro utilizado para fertilizar los ovocitos (27) in vitro o in vivo o la propia combinación de progenitores (25) pueden afectar el resultado final.

Los factores vinculados con el operador, su experiencia y técnica, grado de dificultad y lugar de deposición del embrión en el útero, son también determinantes del índice de concepción (1,31).

Los factores ligados con la receptora tales como raza, categoría, vaca o vaquillona, vaca lechera en producción (6, 10, 15, 28) así como la calidad del cuerpo lúteo tienen influencia sobre el éxito del programa de transferencia de embriones (37, 39). El ambiente y clima son factores que también pueden influenciar el resultado (41, 42).

### Calidad embrionaria

Los embriones bovinos son clasificados de acuerdo con la Sociedad Internacional de Tecnologías Embrionarias (IETS) por su estadio de desarrollo y morfología (23). El código para la calidad embrionaria es numérico y se basa en la integridad morfológica de la masa celular embrionaria, de manera tal que es factible asignar una escala de 1-4, siendo 4 los embriones no viables. Código 1: Excelente o bueno. Masa embrionaria simétrica y esférica con blastómeros uniformes en tamaño, color y densidad. Consistente con la etapa esperada de desarrollo, al menos 85% del material celular intacto y viable. Código 2:

Regular. Irregularidades moderadas en la forma general o en el tamaño, color y densidad de los blastómeros. Al menos 50% del material celular intacto y viable. Código 3: Pobre. Irregularidades importantes en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de los blastómeros. Al menos 25% del material celular intacto y viable.

A pesar de ser una evaluación subjetiva, en el caso de embriones producidos In Vivo el grado de acuerdo entre observadores, fundamentalmente para los extremos de la escala, es aceptable. En el caso de los embriones In Vitro, existe mayor divergencia (3,11) La correlación entre la morfología del embrión bovino y la ultraestructura embrionaria, la expresión génica y la crio resistencia, ha proporcionado evidencia de que se puede deducir mucho más de la mera morfología embrionaria de lo que se pensaba anteriormente (39)

## Resultados en Uruguay

En las siguientes tablas se describen los resultados obtenidos en las transferencias realizadas, de acuerdo con la calidad de los embriones. Las receptoras utilizadas fueron vacas primíparas o múltiparas, con o sin ternero al pie, de razas carniceras (cebuínas o taurinas) y vaquillonas nulíparas de razas carniceras (cebuínas o taurinas) o lecheras (en su gran mayoría Holando).

En nuestro caso, los resultados de la transferencia de embriones de Calidad 3, no fueron analizados, debido a su bajo número por establecimiento. Es importante señalar que la tasa de concepción de los embriones calidad 3 puede superar el 25%. La decisión de transferirlos depende de la disponibilidad de receptoras, de las necesidades del productor y la posibilidad de criopreservación. Estos embriones de Calidad 3, son afectados considerablemente por proceso de congelación. Dado que el procedimiento reduce aún más el número de blastómeros viables, la viabilidad general de estos embriones será menor. (36)

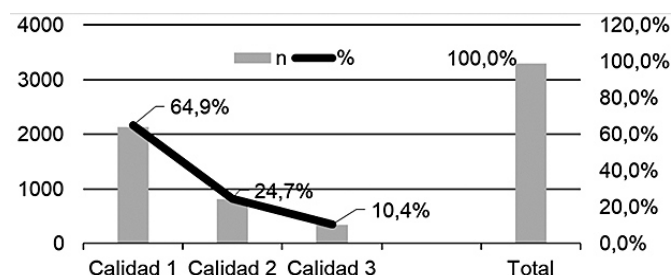


Figura 2. Distribución de la calidad de los embriones transferidos in vivo frescos en el total de establecimientos (incluyendo aquellos con menos de 5 transferencias).



## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tanto con los embriones IVD frescos o congelados, o IVP resultan comparables con los reportados por la literatura. La diferencia de preñez entre embriones de Calidad 1 y 2 resultó ser de 16%, 22% y 15,5% para embriones IVD frescos, IVD congelados y IVP frescos respectivamente. La menor viabilidad de los embriones de menor calidad, expresada como blastómeros irregulares o no viables, células extruidas, etc. se ve reflejada en estas diferencias.

En el caso de los embriones IVD o IVP, que fueron transferidos en fresco y no tuvieron que atravesar por el proceso de criopreservación, estas diferencias son menores que para los embriones congelados. En este caso, la tasa de gestación de los embriones de calidad 2 fue 22% menor a los de calidad 1. Los embriones sufren un considerable daño morfofuncional cuando son criopreservados. El alcance de las lesiones por criopreservación dependen de factores como la permeabilidad de la membrana, tamaño, forma de las células y calidad de los blastómeros (24) Se ha demostrado que la calidad del embrión en el momento de la congelación puede influir en la viabilidad posterior a la descongelación (20)

Los porcentajes de gestación reportados para embriones IVD frescos son similares a los comunicados en diversos trabajos. Para embriones IVD transferidos en vaquillonas de razas carniceras sincronizadas con

un protocolo Ovysinch los porcentajes de gestación fueron 44,1%, y 32,6% para Calidad 1 (n=351) y Calidad 2 (n=267) respectivamente (9) La categoría de receptora, vacas vs vaquillonas, determinó diferencias significativas en la preñez medida a los 30 días para embriones de calidad 1, 2 y 3: 41.5% vs 52.3% respectivamente (18) En nuestro caso, no fueron analizados los resultados por categoría ni raza de la receptora, sin embargo, para los embriones transferidos sobre vaquillonas Holando (n=502, 13 establecimientos) el porcentaje de preñez para embriones calidad 1, 2 y 3 agrupados fue de 65.3% (S. Kmaid, no publicado). La calidad del embrión resultó tener un impacto significativo en la preñez de las vacas, 45.1%, 25,0 y 12,5 % para embriones de calidad 1, 2 y 3 respectivamente. Sin embargo, las diferencias de calidad embrionaria no resultaron en diferencias de preñez, cuando las receptoras fueron vaquillonas (18) Para vaquillonas Holando, nuestros resultados fueron 73,5%, 51,5% y 45,2% para embriones calidad 1, 2 y 3 respectivamente. Los resultados reportados por Hasler y col. (14) en 5.825 receptoras transferidas en fresco para embriones clasificados como buenos o regulares, fueron 73% y 60% respectivamente. En este caso la escala de evaluación es diferente a la utilizada por nosotros (IETS). Por otra parte, las receptoras fueron vaquillonas nulíparas, de raza Holando (340-410 kg.), manejadas por el mismo propietario. Esto contrasta con nuestros datos, en 37 predios, diferentes categorías (vacas, vaquillonas), razas

**Tabla 4.** Influencia de la calidad embrionaria sobre las tasas de concepción (receptoras preñadas/receptoras transferidas) para embriones producidos In Vivo (IVD) en predios con más de 5 embriones transferidos (S. Kmaid, no publicado)

Establecimientos	Transferidos Calidad 1 (n)	% Gestación Promedio ± DS	Transferidos Calidad 2 (n)	% Gestación Promedio ± DS	Total	% Gestación Promedio ± DS
37	1.974	62,3 ± 13,5a	781	46,2 ± 19,0b	2.755	54,2 ± 11,4

a,b, p< 0,0001

**Tabla 5:** Influencia de la calidad embrionaria sobre las tasas de concepción (receptoras preñadas/receptoras transferidas) para embriones congelados producidos In Vivo (IVD) en establecimientos con más de 5 embriones transferidos (se excluyen los embriones congelados por terceros) (S. Kmaid, no publicado)

Establecimientos	Transferidos Calidad 1 (n)	% Gestación Promedio ± DS	Transferidos Calidad 2 (n)	% Gestación Promedio ± DS	Total	% Gestación
15	500	55,2 ± 12,6a	189	33,3 ± 16,5b	689	44,3 ± 18,2

a,b, p< 0,0001

**Tabla 6.** Influencia de la calidad embrionaria sobre las tasas de concepción (receptoras preñadas/receptoras transferidas) para embriones producidos In Vitro (IVP) en establecimientos con más de 5 transferencias (S. Kmaid, no publicado)

Establecimientos	Transferidos Calidad 1 (n)	% Gestación Promedio ± DS	Transferidos Calidad 2 (n)	% Gestación Promedio ± DS	Total	% Gestación Promedio ± DS
31	1.665	41,9 ± 14,0a	259	26,4 ± 24,8b	1.934	34,2 ± 21,5

a,b, p< 0,001

y condiciones de manejo. Es interesante que, para los embriones clasificados por como pobres (n=76) la tasa de gestación fue de 41%, similar al 46.2% comunicado en esta presentación para los embriones de calidad 2. Ferraz y col (13) utilizando como receptoras vaquillonas Holando y vacas con más de 120 días en leche, reportan para embriones IVD sin distinción de calidad 49,3% de gestación (n=867) y 36.8% para embriones IVD congelados (n=1.725)

Los porcentajes de gestación obtenidos para los embriones IVP (34,2%) son comparables con los reportados por JHF Pontes y col. (28), 36.6% en 1974 transferencias sobre vaquillonas cruza Nelore x Simmental, sincronizadas con Prostaglandina, para embriones de calidad 1 y 2 en conjunto. En Uruguay, Origen ha reportado un porcentaje promedio de preñez de 52.9%, para embriones de calidad 1 (32). Esto es superior al reportado por nosotros 41,9% sobre 1.665 transferencias para embriones de calidad 1. Los embriones en este caso fueron producidos por un laboratorio diferente. Es probable que esto pueda reflejar la diferencia en el resultado final de preñez. Tanto los protocolos utilizados, los medios de cultivo, la calidad de los ovocitos, el semen, la categoría y raza de la donante y la época de aspiración (verano, invierno) entre otros, pueden afectar la eficiencia del sistema de producción In Vitro y la tasa de gestación obtenida (30)

Los resultados para embriones IVP de calidad 1 y 2 son más bajos que para los embriones in vivo frescos o congelados: 52,4%, 44,3% y 34,2% respectivamente. Esta situación se relaciona a las condiciones intrínsecas de los embriones producidos In Vitro. Las anomalías cro-

mosómicas en embriones IVP, pueden afectar su viabilidad posterior (5) Estudios recientes sugieren que existen diferencias en el potencial secretor entre los embriones IVP y los producidos in vivo y en las características del trofotodermo (7) Estudios transcriptómicos que comparan embriones bovinos desarrollados in vitro o in vivo han reportado diferencias en la expresión génica y los patrones de metilación, revelando mecanismos moleculares relacionados con la mayor capacidad de desarrollo de embriones producidos in vivo (2)

## Factores vinculados con el operador y la dificultad en la transferencia

Entre otros factores vinculados con el resultado de un programa de TE está el técnico responsable de evaluar las receptoras y realizar las transferencias.

En la siguiente tabla (S. Kmaid, no publicado) se ilustran los resultados de preñez para 5 técnicos veterinarios en diferentes establecimientos, para embriones producidos In Vitro. Los técnicos C y D, señalados con un asterisco, poseían menos experiencia en transferir embriones que los restantes técnicos.

El técnico tiene un efecto en la ubicación del embrión, facilidad y tiempo de transferencia (31), con lo que es esperable que técnicos con menor experiencia, tengan mayor dificultad, coloquen el embrión en un sitio no adecuado y tarden más tiempo en transferir.

La facilidad con que el cérvix es atravesado puede implicar una mayor probabilidad de preñez, 1,43 vs 1,29 en transferencias sin dificultad o con dificultad moderada respectivamente. A su vez, el porcentaje de preñez es mayor si el embrión es depositado en el tercio craneal vs tercio medio del cuerno en relación con el extremo oviductal, 41,0% vs 29,6%. (1)

En nuestro caso, analizamos los porcentajes de gestación de acuerdo con el score de dificultad en la transferencia y la localización del embrión en el cuerno uterino. La escala es de 1 a 3 en la dificultad, siendo 1 sin dificultad y 3 muy difícil. Para la localización, las transferencias

**Tabla 8.** Porcentaje de gestación de acuerdo con la dificultad y localización del embrión

Dificultad	Transferidos	% Preñez
1	335	53,8%
2-3	5	20,0%
Ubicación		
Craneal	314	53,8%
Medio	23	56,5%
Caudal	2	100%

**Tabla 7.** Tasa de preñez de embriones IVP para diferentes técnicos.

Técnico	Establecimientos	Embriones transferidos	Receptoras Preñadas	Preñez Promedio ± DS
A	3	107	42	0.41 ± 0.09
B	5	96	38	0.38 ± 0.25
C*	1	34	9	0.26 ± 0.0
D*	1	8	2	0.25 ± 0.0
E	8	176	81	0.50 ± 0.18
TOTAL	18	421	172	0.43 ± 0.38

\*Menor experiencia

fueron clasificadas en craneales, medias y caudales, con respecto al extremo oviductal (S. Kmaid y A. Menchaca, no publicado)

No encontramos diferencias la localización del embrión. Con referencia a la facilidad en la transferencia, menos del 2% fueron con algún grado de dificultad, lo cual no posibilita el análisis.

### Utilización de antiinflamatorios no esteroideos en la transferencia de embriones (AINEs)

Los resultados de la TE no han mejorado sustancialmente a lo largo de los años a pesar de las mejoras en diversos aspectos de los procedimientos relacionados con el manejo de las receptoras, las destrezas de los técnicos y los métodos de producción y criopreservación de embriones. La manipulación uterina durante la transferencia embrionaria causa la liberación de PGF2 del endometrio uterino, lo que puede alterar el desarrollo embrionario y resultar en una disminución de las tasas de preñez (34). Muchos equipos de trabajo dedicados a la TE no logran resultados satisfactorios. Por esta razón, se han hecho numerosos intentos para mejorar la eficiencia de la técnica. Una de las soluciones más prometedoras es la administración de inhibidores de prostaglandinas y sus derivados, principalmente antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (17). El número de preñeces después de la transferencia de embriones en receptoras tratadas con ibuprofeno resultó ser significativamente mayor: 41 de 50; 82% y el control, 28 de 50; 56% (8). La administración de Flunixin de Meglumine en el momento de la transferencia embrionaria mejoró las tasas de preñez en receptoras

**Tabla 9:** Tasa de preñez en receptoras de embriones bovinos IVD frescos tras el tratamiento con ácido Tolfenámico según calidad del embrión

	Ac. Tolfenámico		Control	
	Transferidos	% Preñez	Transferidos	% Preñez
Calidad 1	234	56,4	238	56,7
Calidad 2	85	51,8	79	48,1
Calidad 3	18	61,1	17	52,9

**Tabla 10.** Tasa de preñez en receptoras de embriones bovinos IVD congelados tras el tratamiento con ácido Tolfenámico según estadio de desarrollo de los embriones

	Ac. Tolfenámico		Control	
	Transferidos	% Preñez	Transferidos	% Preñez
Mórulas	292	54,8	292	53,8
Blastocisto Temprano	33	57,6	31	58,1
Blastocistos	8	75,0	9	55,6

transferidas con embriones IVD frescos y congelados de calidad 2: 64,2% vs 53,5% flunixin vs control respectivamente (34). En ratonas, el uso de ácido Tolfenámico en la transferencia embrionaria mejoró el mantenimiento de la preñez y la supervivencia embrionaria (35)

Nosotros analizamos retrospectivamente los datos de transferencia de embriones IVD, 261 frescos y 442 congelados, en 13 establecimientos, donde 353 fueron tratados con Ac. Tolfenámico (Tolfedine, Vetoquinol, Francia) y 350 fueron tomados como control (19) No se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el control, 56,7% vs 54,9%.

**Tabla 9:** Tasa de preñez en receptoras de embriones bovinos IVD frescos tras el tratamiento con ácido Tolfenámico según calidad del embrión

**Tabla 10.** Tasa de preñez en receptoras de embriones bovinos IVD congelados tras el tratamiento con ácido Tolfenámico según estadio de desarrollo de los embriones

A pesar de las tendencias numéricas que muestran resultados prometedores con el uso de ácido Tolfenámico en el momento de la transferencia de embriones, se necesitan estudios adicionales para lograr una conclusión sólida

## CONCLUSIONES

Varios factores influyen las tasas de preñez en los programas de transferencia de embriones en bovinos. El origen de los embriones, In Vivo o In Vitro, la situación, frescos o congelados, afectan el resultado final. Unos de los factores más relevante es la calidad embrionaria, pero también la destreza del técnico, el grado de dificultad y el sitio de deposición del embrión tienen que ser considerados. La aplicación de un antiinflamatorio no esteroide al momento de la transferencia parece ser una alternativa prometedora, fundamentalmente en el caso de embriones congelados o de menor calidad.

## AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a Andrea Pinczak, Jose Miguel Saldaña y Rodolfo Ungerfeld por los aportes a esta área del conocimiento.

## Bibliografía

Alkan H, Karaşahin T, Dursun S, Satılmış F, Erdem H and Güler M. Evaluation of the Factors that Affect the

Pregnancy Rates During Embryo Transfer in Beef Heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 2020 (55)4 1-8.

Banliat Ch, Mahé C, Lavigne R, Com E, Pineau Ch, Labas V, Guyonnet B, Mermillod P and Saint-Dizier M. The proteomic analysis of bovine embryos developed in vivo or in vitro reveals the contribution of the maternal environment to early embryo. *BMC Genomics* (2022) 23:839.

Barfield J. Evaluation of in vitro-produced bovine embryos. 2015. CETA/ACTE & AETA JOINT CONVENTION, ONTARIO.

Besbaci M, Abdelli A, Belabdi I and Raboisson D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs at embryo transfer on pregnancy rates in cows: A meta-analysis. *Theriogenology* 171 (2021) 64-71.

Bouwman AC and Mullaart E. Screening of in vitro-produced cattle embryos to assess incidence and characteristics of unbalanced chromosomal aberrations. *JDS ACC Communications*, 2023; 4:101–105.

Demetrio D. The Influence of Embryo and Recipient Selection on Bovine IVF Embryo pregnancy Outcome. 2019 AETA and CETA/ACTE Joint Convention Proceedings, Colorado, 2019.25-29.

Ealy AD, Lydia K. Wooldridge, and Sarah R. McCoski Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *J. Anim. Sci.* 2019.97:2555–2568.

Elli M, Gaffuri B, Frigerio A, Zanardelli M, Covini D, Candiani M and Vignali M. Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction* (2001) 121, 151–154.

Erdem H, Karasahin T, Alkan H, Dursun S, Satilmis F and Guler M. Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Trop Anim Health Prod.* 2020 Sep;52(5):2541-2547.

Estrada-Cortés E, Ortiz WG, Chebel RC, Jannaman EA, Moss JI, Cavallari de Castro F, M Zolini AM, Staples ChR, Hansen PJ. Embryo and cow factors affecting pregnancy per embryo transfer for multiple-service, lactating Holstein recipients. *Translational Animal Science*, Volume 3, Issue 1, January 2019, Pages 60–65

Farin PW, Britt JH, Shaw DW and Slenning BD. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* .1995,44(3), 339-49.

Farin PWF and Farin CE. Transfer of Bovine Embryos Produced in Vivo or in Vitro: Survival and Fetal Development. *Biology of Reproduction*, Volume 52 (3) 1995, 676–682.

Ferraz PA, Burnley C, Karanja J, Viera-Neto A, San-

tos JEP, Chebel RC and Galvão KN. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology* 2016, 86 (2016) 1834–1841.

Hasler JF. Bovine embryo transfer: are efficiencies improving? Applied Reproductive Strategies Conference Proceedings August 5th & 6th, 2010 Nashville, TN.

Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Foote RH. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 1987, Vol 27 (1), 139-168.

IETS Data Retrieval Report 2021. *Embryo Technology Newsletter*, v. 40, (4) 2022.

Jaskowski, B.M.; Opalka, A.; Gehrke, M.; Herudzinska, M.; Czeladko, J.; Baumgartner, W.; Jaskowski, J.M. A Critical Overview on Prostaglandin Inhibitors and Their Influence on Pregnancy Results after Insemination and Embryo Transfer in Cows. *Animals* 2021, 11, 3368.

Kara U, Çoban S, Say E, Hizli H, H. Mutlu, Y.Nak, H. Ağirkaya, T. Ayaşan, M.A. Çoşkun, A. Asarkaya, H.E. Erten, İ Yilmaz, E. Yazgan, İ.E. Erdoğan, Z.M. Erten, Ş. Ergül, F. Sert. Effect of embryo quality on pregnancy outcome in recipient cows and heifers. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2020. 71(2), 2235–2242

Kmaid S, Menchaca A and Renaud P. Pregnancy rate after tolfenamic acid treatment in bovine embryo recipients. 2023 The 11th International Ruminant Reproduction Symposium, Galway, Ireland.

Kennedy LG, Boland MP and Gordon I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology*, 1983, Vol 19 (6) 823-832.

Larocca, C. Kmaid,S., Romano,J.E., Calvo,J, Vigueira,M, Dochi,O. Primera obtención de dos preñeces en bovinos por embriones producidos in vitro en el Uruguay. *Veterinaria* 1994 (29) 122. Abril - junio.

Mapletoft RJ. and Bó GA. Bovine Embryo Transfer. 2016 *Reviews in Veterinary Medicine* by Revah I. <https://www.ivis.org/library/reviews-veterinary-medicine/bovine-embryo-transfer>.

Mapletoft RJ, Remillard R, and Lindsey BR. Certification and Identification of Embryos. Chapter 9.2023 IETS Manual 5th Edition, January.

Marsico TV, de Camargo J, Valente RS y Sudano MJ. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. 2019 Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society.

Martin AAA, Id-Lahoucine S, Fonseca PAS, Rochus



CM, Alcantara LM, Tulpan D, LeBlanc SJ, Miglior F, Casellas J, Cánovas A, Baes CF and S. Schenke FS. Unravelling the genetics of non-random fertilization associated with gametic incompatibility. *Sci Rep* (2022) 12, 22314

Miller S. Genomic selection in beef cattle creates additional opportunities for embryo technologies to meet industry needs. (2023) *Reproduction, Fertility and Development*, 35(1–2), 98–105.

Ortega MS, Moraes JGN, Patterson DJ, F Smith MF, Behura SK, Pooch S and Spencer TE. Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. *Biol Reprod*. 2018 Dec 1;99(6):1244-1254.

Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP and Seneda MM. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle. (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011 (75) 1640–1646

Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler F and Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 71 (2009) 690–697.

Rodrigues Nogueira BG, Arantes de Souza LF, Zaneti Puelker R, I. Giometti RIC, Merlo Garcia Firetti S, Szücs T, Barros Dias DS y Castilho C. Factors affecting the in vitro production of bovine embryos in a commercial program. *Research, Society and Development*, 2021 (10) 2, e16110212264, (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 |

Roper DA, Schrick FN, Edwards JL and Hopkins FM, Prado TM, John B. Wilkerson, Arnold M. Saxton, Charles D. Young and W. Brandon Smith. Factors in cattle affecting embryo transfer pregnancies in recipient animals. *Animal Reproduction Science* 2018(199) 79–83.

S. Dutra. Producción de embriones In Vitro. *Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos*. IRAUy, noviembre 2021.

Say E., Ozmen MF, Sagirkaya H. The Influence of Corpus Luteum Size on the Conception in Embryo Transfer Recipient Cows. *Livestock Studies* 2021. 61(2), 77-8.

Scenna FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Rohrbach NR, Wehrman ME and Schrick FN. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 78 (2005) 38–45

Schlapp G, Goyeneche L, Fernández G, Menchaca A and Crispo M. Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice *Assist Reprod Genet* (2015) 32:271–275.

Shea BF, R.E. Janzen RE, R.J. McAlister, D.P. McDermand. Freezing of bovine embryos: Effects of embryo quality, time from thawing to transfer and number frozen per vial. *Theriogenology* 1983 Vol.20 (2), 205-212.

Spell AR, Beal WE, Corah LR and Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 2001, Vol 56 (2), 287-297.

Sommer MM and Youngs CR. Impact of Embryo Transfer Technology on the Production of Artificial Insemination Sires for the U.S. Dairy Cattle Industry. *Iowa State University Animal Industry Report*. 2016 A.S. Leaflet R3072.

Thomson SP, Holmes RJ, Landes PT and Anllworth MB. Assessment and selection of the recipient cows' corpus luteum at the time of embryo transfer, and its influence on conception rate. *Aust Vet J* 2021 (99):288–292.

Van Soom A. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? - *Reproductive BioMedicine Online* 2003 Vol 7(6) 664-670.

Vasconcelos JLM, Demétrio DGB, Santos RM, Chiari JR, Rodrigues CA and Sá Filho OG. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. 2006. *Theriogenology* Vol 65 (1), 7, 192-200.

Viana Alves Diniz J, Oliveira da Silva L, Bento Nogueira MM, Ramos de Freitas R, Luckner MN, Satrapa RA, Dell'Aqua Junior JA and Oba E. Bioclimatic Influence on the Pregnancy Rate in Embryo-Recipient Cows in the Amazonian Biome. *Reproductive Biology and Technology in Animals* 2020.

Vishwanath, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*. Volume 59, Issue 2, 15 January 2003, 571-584.

Zubor T, Holló G, Pósa R, Nagy-Kiszlinger H, Vigh Z and Húth B. Effect of rectal temperature on efficiency of artificial insemination and embryo transfer technique in dairy cattle during hot season. *Czech Journal of Animal Science*, 65, 2020 (08): 295–302.