



UNIVERSIDAD  
SAN SEBASTIAN  
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA  
CARRERA MEDICINA VETERINARIA  
SEDE CONCEPCIÓN**

**PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN RUMIANTES EN PELIGRO DE  
EXTINCIÓN COMO METODO DE PRESERVACIÓN  
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

Memoria para optar al título de Médico Veterinario

Profesor Tutor: Dr. Sc. Joel Gustavo Cabezas Salazar MV  
Estudiante: **Jared Lican Ortiz Saldivia**

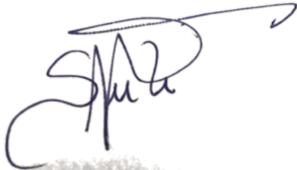
**® Jared Lican Ortiz Saldivia**

Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Concepción, Chile  
2025

## **CALIFICACIÓN DE LA MEMORIA**

En Concepción, el día 10 de Julio de 2025, los abajo firmantes dejan constancia que el alumno **Jared Lican Ortiz Saldivia** de la carrera de MEDICINA VETERINARIA ha aprobado la memoria para optar al título de MÉDICO VETERINARIO con una nota de **5,5**.



---

MCs. Edgardo Antonio Sepúlveda Navarrete MV  
Presidente Comisión



---

DCs. Álvaro Javier Opazo Valdés MV  
Profesor Evaluador



---

DCs. Joel Gustavo Cabezas Salazar  
Profesor Patrocinante

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis papás, Pamela y Víctor, por apoyarme desde el momento cero en este sueño de ser médico veterinario.

A mi pareja, María Jesús, por acompañarme, apoyarme y soportarme en este proceso de ser estudiante.

A mi hijo, Lukas, por ser la motivación que me faltaba para terminar esta etapa.

A mis suegros, Cristian y Lilian, por abrirme las puertas de su casa y quererme como a un hijo más.

A Fiel, Fiela y Pancho, por iniciar este proceso y ahora acompañarme desde el cielo.

A Leufü y Kaiser, por ser mis compañeros de estudio.

Y a mí, porque cuando pude darme por vencido, lo volví a intentar.

## TABLA DE CONTENIDOS:

<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	6
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1 Biotecnología en reproducción de rumiantes en peligro de extinción. ....	11
1.2 Ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) .....	12
1.3 Fecundación in vitro (FIV) .....	12
1.4 Transferencia nuclear de células somáticas (SNTC) .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
2.1.- Objetivo general .....	14
2.2.- Objetivos específicos .....	14
<b>3. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	15
3.1 Materiales .....	15
3.2 Métodos .....	15
3.3 Análisis de datos .....	16
<b>4. RESULTADOS</b> .....	17
4.1 Revisión de literatura científica .....	17
4.2 Estado de conservación de las especies .....	20
4.3 Técnicas de producción de embriones empleadas .....	21
4.4 Parámetros cuantitativos sobre tasas de desarrollo embrionario .....	25
4.5 Análisis específico de especies en categoría .....	26
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	30
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	33
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	34

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Artículos identificados sobre producción de embriones en rumiantes silvestres. ....	188
<b>TABLA 2.</b> Estado de conservación de las especies encontradas. ....	20
<b>TABLA 3.</b> Técnicas utilizadas en la producción de embriones. ....	21
<b>TABLA 4.</b> Parámetros de desarrollo embrionario reportados en rumiantes silvestres...	25
<b>TABLA 5:</b> Estadísticas descriptivas de tasa de blastocistos (%) en especies de cérvidos en categoría de Vulnerable o En Peligro.....	26
<b>TABLA 6:</b> Estadísticas descriptivas de tasa de blastocistos (%) en especies de cérvidos en categoría de Vulnerable o En Peligro.....	27

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Revisión de publicaciones científicas .....	18
<b>Figura 2:</b> Distribución del número de estudios y de tasas de blastocistos.....	23
<b>Figura 3:</b> Análisis descriptivo de la tasa de mórulas.....	24
<b>Figura 4:</b> Analisis descriptivo de la tasa de blastocistos.....	24
<b>Figura 5:</b> Comparativa de técnicas entre especies vulnerables o en peligro.....	28
<b>Figura 6:</b> Comparativa entre FIV vs MOET, MOET vs SNTC y FIV vs SNTC .....	29

## RESUMEN

La disminución de especies ha mostrado un preocupante aumento en las últimas décadas, debido en mayor parte a factores antropogénicos que han mermado poblaciones de animales silvestres. Las tecnologías reproductivas, también conocidas como ARTs (técnicas de reproducción asistida), han sido enfocadas en su mayoría en el aumento y mejora de la producción animal. Sin embargo, también tienen el potencial de desempeñar un papel crucial en el resguardo de material genético de individuos, así como en la mejora de la eficiencia reproductiva de animales silvestres en peligro de extinción. Dentro de las ARTs, la producción de embriones es una herramienta que permite preservar el valor genético de los animales y producir un nuevo individuo. Estas técnicas presentan ventajas y desventajas comparativas entre sí, con amplias descripciones en animales de producción, en especial en rumiantes. No obstante, en rumiantes silvestres en peligro de extinción no existen estudios sistemáticos actualizados que comparen las diferentes técnicas utilizadas en la producción de embriones.

El objetivo de esta revisión bibliográfica sistemática cualitativa fue determinar que técnicas generan mayores tasas de producción de embriones (expresadas como porcentaje), entre especies de rumiantes silvestres en peligro de extinción. Considerando la actual problemática de destrucción del medio ambiente y pérdida de biodiversidad, cabe preguntarse ¿Qué aporte real hacen las técnicas de producción embrionarias a la conservación y perpetuación de especies en peligro de extinción?

La recopilación de información se realizó en las siguientes bases de datos: Google Scholar, Pubmed, ResearchGate y Scielo utilizando los operadores booleanos “AND” y “OR” y los términos de búsqueda “tecnología de reproducción asistida”, “Fecundación in vitro”, “ovulación múltiple”, “transferencia de embriones”, “peligro de extinción” y “rumiantes silvestres” con sus equivalentes en inglés. Los estudios fueron seleccionados según criterios de inclusión y exclusión, Los cuales debían estar en inglés o español, un periodo entre 2007 y 2024 y no presentar conflicto de interés.

**Palabras claves:** Tecnología de reproducción asistida, Fecundación in vitro, Ovulación múltiple, transferencia de embriones, rumiantes silvestres, peligro de extinción.

## ABSTRACT

Species decline has shown a worrying increase in recent decades, largely due to anthropogenic factors that have depleted wild animal populations. Reproductive technologies, also known as ARTs (assisted reproductive techniques), have largely focused on increasing and improving animal production. However, they also have the potential to play a crucial role in safeguarding the genetic material of individuals, as well as improving the reproductive efficiency of endangered wild animals. Among ARTs, embryo production is a tool that preserves the genetic value of animals and produces a new individual. These techniques present comparative advantages and disadvantages, with extensive descriptions in production animals, especially ruminants. However, there are no updated systematic studies comparing the different techniques used in embryo production in endangered wild ruminants. The objective of this qualitative systematic literature review was to determine which techniques generate higher embryo production rates (expressed as a percentage) among endangered wild ruminant species. Considering the current problems of environmental destruction and loss of biodiversity, the question arises: What is the real contribution of embryo production techniques to the conservation and perpetuation of endangered species?

Information was collected from the following databases: Google Scholar, Pubmed, ResearchGate and Scielo using the Boolean operators “AND” and “OR” and the search terms “assisted reproductive technology”, “in vitro fertilization”, “multiple ovulation”, “embryo transfer”, ‘endangered’ and “wild ruminants” with their English equivalents. The studies were selected according to inclusion and exclusion criteria, which had to be in English or Spanish, a period between 2007 and 2024 and not present a conflict of interest.

**Key words:** Assisted reproductive technology, in vitro fertilization, multiple ovulations, embryo transfer, wild ruminants, endangered species.

## 1. INTRODUCCIÓN

La conservación de especies ha sido un tema relevante para los investigadores en las últimas décadas debido a la disminución de distintas especies por efectos antropogénicos como la destrucción de su hábitat natural, la caza, la destrucción y fragmentación de su hábitat natural, entre otros (Mogey et al., 2019). En este contexto, las tecnologías de reproducción asistida (TRA) se han propuesto como un medio para superar los importantes desafíos que supone gestionar poblaciones pequeñas y aisladas de especies en peligro de extinción (Herrick, 2019). Estas, tienen un enorme potencial para la conservación de la vida silvestre, por lo que se han logrado muchos avances en las últimas décadas (Bolton et al., 2022). Las principales ARTs orientadas a la producción de embriones *in vitro* son la fecundación in vitro (FIV), la transferencia nuclear de células somáticas (SNTC) y la ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) (Souza et al., 2011). Estas técnicas, en su mayoría han sido desarrolladas para mejorar la productividad de especies domésticas, con un enfoque en producción animal, han comenzado a ser adaptadas y aplicadas a rumiantes en peligro de extinción con el objetivo de contribuir a su conservación (Andrabi & Maxwell, 2007).

El objetivo de la conservación hace referencia a una garantía a la supervivencia y evolución de las especies y poblaciones en su hábitat nativo, dado que la diversidad biológica es la clave para el mantenimiento de la vida como la conocemos. Es por ello, que todas las acciones encaminadas a preservar especies son importantes para evitar la pérdida de su material genético de forma definitiva (Souza et al., 2011). En Chile, algunos rumiantes no son la excepción y según datos de la Unión internacional para la conservación de la naturaleza (IUCN) en nuestro país el Huemul (*Hippocamelus bisulcus*) se encuentra en peligro de extinción con un número aproximado de 1048-1500 de individuos maduros (Black-Decima, 2016). Además, en estado *vulnerable* la Taruca (*Hippocamelus antisensis*) con un número aproximado de entre 4162 y 5720 individuos (Barrio et al., 2017). y en estado casi amenazado el pudú (*Pudu puda*) sin un número aproximado oficial (Silva-Rodriguez et al., 2016).

## 1.1 Biotecnología en reproducción de rumiantes en peligro de extinción.

La biotecnología en reproducción está representada como un conjunto de técnicas a las que se le denomina tecnologías de reproducción asistida (*Assisted Reproductive Technologies: ARTs*), las cuales son consideradas herramientas valiosas en la conservación genética (Cseh & Solti, 2000). Además de preservar la variabilidad genética y ampliar el potencial reproductivo de individuos específicos, las ARTs pueden desempeñar un rol fundamental para la conservación de especies, no solo aquellas afectadas por acción del ser humano si no también, para aquellas que pueden estar relacionadas a una alta prevalencia de enfermedades en vida silvestre como es la tuberculosis y brucelosis, en el caso de los bisontes en Canadá (Thundathil et al., 2009). Para la conservación de los recursos genéticos, se han propuesto dos enfoques: *in situ* y *ex situ*. El primero es ideal, ya que la conservación de especies vivas se produce en sus hábitats naturales, mientras que el segundo, se ocupa de la protección de los componentes de la diversidad biológica fuera de sus hábitats naturales (Souza et al., 2011). Ambos enfoques, pueden beneficiarse de manera significativa de las ARTs, dentro de las cuales se incluyen técnicas como la recolección y almacenamiento de semen y ovocitos, la transferencia de embriones, la fertilización *in vitro*, la micromanipulación de gametos y embriones, y los bancos de recursos genéticos (Andrabi & Maxwell, 2007). Sin embargo, las ARTs también se ven supeditadas por ciertos factores como la estacionalidad reproductiva que, a su vez, se encuentra condicionada por el fotoperiodo o la disponibilidad de recursos nutricionales, las cuales influyen en el éxito de estas herramientas biotecnológicas (Mastromonaco & González-Grajales, 2020).

A pesar de estas limitaciones, se han logrado avances significativos en las distintas ARTs. Por ejemplo, se ha obtenido *in vitro* la producción de blastocitos del *Bison bonasus*, especie que se encontraba en estado de “vulnerable” (Duszewska et al., 2018), y que, en la actualidad, gracias a los esfuerzos en conservación, ha mejorado su categoría a “Casi amenazado” (Plumb et al, 2020).

A continuación, se describirán ARTs que están orientadas a la producción de embriones y que han sido utilizadas en rumiantes en peligro de extinción.

## 1.2 Ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET)

Esta técnica se refiere a la superestimulación ovárica para inducir una ovulación múltiple en las hembras donantes. Ha sido empleada para la producción y preservación de embriones de especies amenazadas (Palomino et al., 2016).

Las hembras donantes se inseminan y los embriones se desarrollan en el útero hasta su recolección por medio de un lavado uterino que se suele realizar en el séptimo día post-inseminación (Machaty et al., 2012). Los embriones recolectados pueden ser transferidos a hembras receptoras que llevarán la gestación a término, o pueden ser sometidos a procesos de criopreservación, para ser utilizados con posterioridad (Fuentes et al., 2004). Esta técnica implica la sincronización del estro, la estimulación ovárica, la inseminación artificial y la recuperación de embriones. Este procedimiento requiere al menos siete a diez manipulaciones del animal y una o dos anestesias (una para inseminación intrauterina y otra para recuperación de embriones) (Locatelli et al., 2012). Esta complejidad representa una desventaja, ya que el estrés inducido puede comprometer el éxito reproductivo (Schiewe et al., 1991).

Una estrategia clave adicional en conservación es la aplicación de MOET entre especies distintas, denominada MOET interespecífica (MOETi), que consiste en la transferencia de embriones de especies amenazadas a hembras receptoras de especies no amenazadas (Souza et al., 2011).

## 1.3 Fecundación in vitro (FIV)

La producción *in vitro* de embriones ha adquirido una relevancia creciente como herramienta para la conservación *in situ* y *ex situ* (Korzekwa & Kotlarczyk, 2021). Esta técnica consiste en la fecundación de un óvulo por un espermatozoide fuera del cuerpo de la hembra, para luego transferir el o los embriones al útero de una hembra receptora (Roldán y Garde, 2004). Implica el cultivo temporal (máximo 12 horas) del óvulo haploide maduro (M-II) junto con  $\geq 10^{-1}$  espermatozoides capacitados. Un espermatozoide competente penetrará la zona pelúcida y la membrana vitelina, el oolema. La fecundación se produce por cariogamia y, si tiene éxito, el cigoto resultante comienza la segmentación entre 24 y 36 horas después. (Hildebrandt & Holtze, 2024)

En comparación con la MOET, la FIV ofrece una ventaja adicional: permite optimizar el uso de semen congelado de machos de alto interés genético, ya que es posible fertilizar cientos de ovocitos con una sola pajuela de semen descongelado (Locatelli et al., 2012)

#### **1.4 Transferencia nuclear de células somáticas (SNTC)**

Conocida de manera popular como “clonación”, esta técnica comenzó en anfibios hace más de 60 años (Gurdon, 1962) y que luego se desarrolló en animales domésticos durante los años 80 y 90's (Roldan & Garde, 2004) Su caso más emblemático fue el nacimiento de la oveja “Dolly” en el año 1996, marcando un hito que atrajo la atención mundial (Wilmut et al., 1997).

La clonación, consiste en la enucleación de un ovocito al cual se le introduce el núcleo de una célula somática, con el fin de formar un nuevo embrión (Ammari et al., 2022). Este proceso implica extraer el ADN de una célula donante y transferirlo a una célula receptora enucleada para crear una copia genética idéntica al donante (Andrabi y maxwell, 2007). Luego, los complejos carioplasto-citoplasmática reconstruidos pueden cultivarse in vitro hasta alcanzar la etapa de blastocisto (Figueiredo et al., 2020).

No obstante, hasta la fecha, la prevalencia de la muerte celular programada en células nucleares de donantes y embriones clonados constituye un factor limitante que afectade manera significativa la eficiencia de esta técnica (Samiec et al., 2019).

a pesar de estas limitantes, la transferencia nuclear de células somáticas representa un avance prometedor en la conservación de especies, con logros incluso en especies que ya habían declarado extintas. (Folch et al., 2009; Souza et al 2011).

Finalmente, cabe destacar que la conservación de especies es fundamental para la biodiversidad y el equilibrio ecológico. En este contexto, las técnicas de producción de embriones han cobrado un rol crucial, no solo para aumentar las tasas de reproducción en cautiverio, sino también para lograr la anhelada reproducción y reintroducción de especies en su hábitat natural. Por ello resulta pertinente preguntarse: ¿Qué métodos de producción de embriones son más eficientes en rumiantes silvestres en peligro de extinción?

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.- Objetivo general**

Determinar la técnica de producción de embriones más eficiente en rumiantes silvestres en peligro de extinción, evaluando las tasas de desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto.

### **2.2.- Objetivos específicos**

1. Cuantificar las tasas de desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto en rumiantes silvestres en peligro de extinción, aplicando diferentes técnicas de producción de embriones.
2. Comparar la eficiencia de las técnicas de producción de embriones mediante el análisis de las tasas de desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto en rumiantes silvestres en peligro de extinción.

### **3. MATERIAL Y MÉTODO**

#### **3.1 Materiales**

Computador portátil (Notebook) Lenovo

Microsoft Word

Microsoft Excel

#### **3.2 Métodos**

Esta revisión bibliográfica es de tipo sistemática, la cual recopiló información de distintos artículos científicos sobre los rumiantes silvestres de interés para este estudio, información la cual se buscó de las siguientes páginas especializadas en documentos académicos y/o científicos.

- Google Scholar
- Pubmed
- Researchgate
- Scielo

Los estudios que se consideraron en esta revisión bibliográfica fueron de tipo cualitativos, considerando únicamente estudios, publicaciones o artículos científicos y excluyendo aquellas que sean revisiones bibliográficas.

Se utilizaron para obtener los resultados estudios científicos desde el año 2007 hasta el año 2025.

Se aceptaron artículos científicos en idioma español, inglés y/o portugués y se consideraron únicamente publicaciones científicas en las cuales no hubo conflicto de interés de parte de los autores con respecto a los resultados de los estudios.

Con respecto a la valorización de los estudios, se les otorgó el mismo peso relativo a todas las referencias por igual, siempre y cuando cumplieran con las exigencias mencionadas en párrafos anteriores.

Se separaron las técnicas y modificaciones a la técnica en un Excel y se distinguieron en un gráfico con sus respectivos resultados.

Se utilizarán los operadores booleanos “AND” y “OR” acompañado de los términos de búsqueda “Fertilización in vitro”, “Fiv”, “ovulación múltiple”, “transferencia de embriones”, “moet”, “transferencia nuclear de células somáticas”, “sntc”, “peligro de extinción” y “rumiantes silvestres” o también en su respectiva traducción en inglés “In vitro fertilization”, “multiple ovulation”, “embryo transfer”, “somatic cell nuclear transfer”, “danger of extinction” y “wild ruminants”

La búsqueda de la información se realizará desde el mes de noviembre del año 2024, hasta mayo del año 2025.

### **3.3 Análisis de datos.**

Se compararon tasas de desarrollo embrionario entre grupos de rumiantes silvestres tratados con tres técnicas de producción de embriones (MOET, FIV y SNTC). Considerando su especie, número total de embriones, número de blastocistos obtenidos, porcentaje de desarrollo y condiciones experimentales. Las tasas de desarrollo embrionario fueron expresadas como porcentajes y se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias en la tasa de blastocistos y un análisis post hoc con el test de Dunn y corrección de Bonferroni considerando significativo un  $p < 0,05$ . Para el análisis de los datos y generación de las gráficas, se utilizó el software R studio (R core Team, 2020).

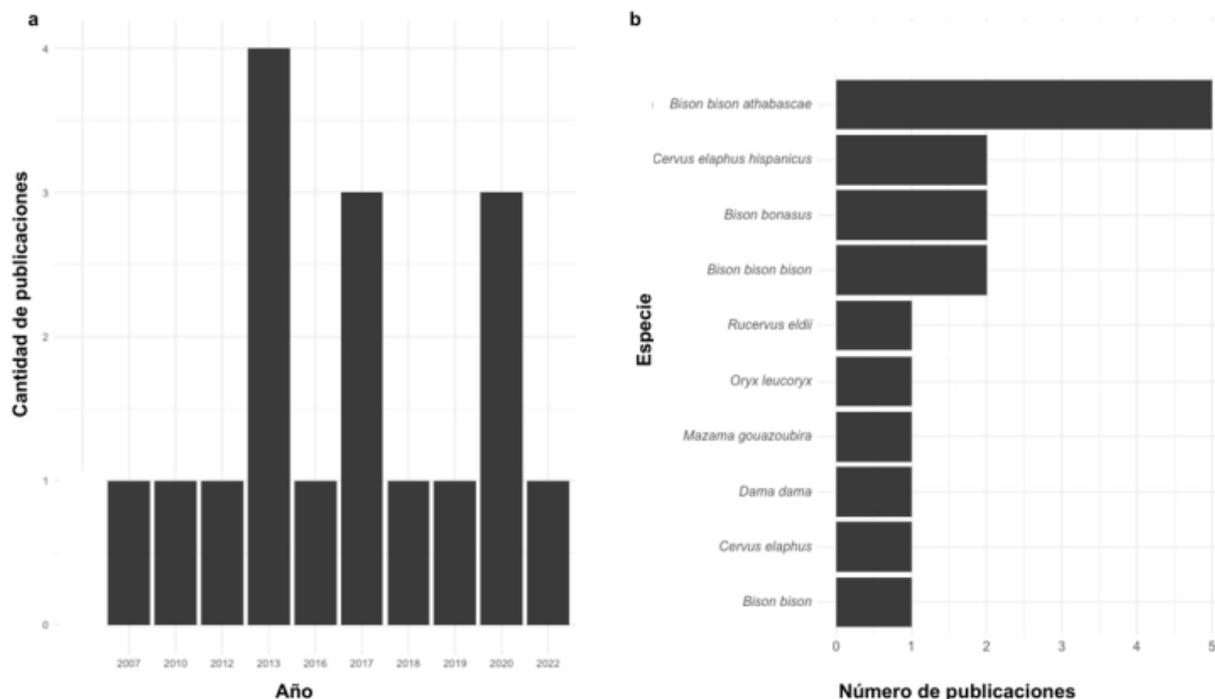
## 4. RESULTADOS

Se revisaron un total de 17 artículos científicos publicados entre 2007 y 2022, que abordan la aplicación de técnicas de producción de embriones en especies de rumiantes silvestres. Las especies estudiadas incluyen tanto cérvidos como bóvidos, con un enfoque particular en especies americanas.

**Objetivo 1: Cuantificar las tasas de desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto en rumiantes silvestres en peligro de extinción, aplicando diferentes técnicas de producción de embriones.**

### **Resultado 1: Revisión de literatura científica**

Se identificaron un total de 17 artículos que abordan técnicas de producción de embriones en rumiantes silvestres publicados entre los años 2007 y 2022. Estos estudios incluyen un total de 8 especies distintas, abarcando diversas categorías de conservación. Siendo el *Bison bison athabascae* la especie más estudiada con 5 estudios, seguida de *Cervus elaphus hispanicus* Y *Bison bison bison* con 3 estudios cada uno, *Bison bison* con 2 estudios y finalmente con un estudio cada uno *Mazama gouazoubira*, *Dama dama*, *Oryx leucoryx* y *Rucervus eldii* (Figura 1). Todos los detalles de los artículos utilizados en esta revisión se resumen en la tabla 1.



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 1:** Revisión de publicaciones científicas sobre producción de embriones en rumiantes silvestres. (a) Cantidad de publicaciones por año entre 2007 y 2022. Se observa una mayor concentración de publicaciones en 2013, 2017 y 2020. (b) Número de publicaciones por especie.

**Tabla 1. Artículos identificados sobre producción de embriones en rumiantes silvestres.**

Especie	Año	Título	Autor
<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	2010	Effect of storage temperature during transport of ovaries on in vitro embryo production in Iberian red deer ( <i>Cervus elaphus hispanicus</i> ).	García-Álvarez et al.
<i>Bison bonasus</i>	2018	Obtaining wisent early blastocyst in vitro is a basic for protection and creation of biodiversity for this threatened species.	Duszewska et al.
<i>Bison bison bison</i>	2020	Production of embryos and a live offspring using <i>post mortem</i> reproductive material from bison ( <i>Bison bison bison</i> ) originating in Yellowstone National Park, USA	Benham et al.
<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	2019	Influence of foetal calf serum supplementation during in vitro embryo culture in Iberian red deer	Iniesta-Cuerda et al.

<i>Mazama gouazoubira</i>	2020	In Vitro Development and Mitochondrial Gene Expression in Brown Brocket Deer ( <i>Mazama gouazoubira</i> ) Embryos Obtained by Interspecific Somatic Cell Nuclear Transfer.	Magalhães et al.
<i>Dama dama</i>	2020	Post-mortem recovery, in vitro maturation and fertilization of fallow deer ( <i>Dama dama</i> , Linnaeus 1758) oocytes collected during reproductive and no reproductive season.	Uccheddu et al.
<i>Bison bison athabasca</i>	2017	Effects of eCG and progesterone on superovulation and embryo production in wood bison ( <i>Bison bison athabasca</i> )	Palomino et al.
<i>Bison bison athabasca</i>	2017	Superovulation in wood bison: Effects of progesterone, treatment protocol and gonadotropin preparations for the induction of ovulation	Palomino et al.
<i>bison bison athabasca</i>	2017	In vitro-production of embryos using immature oocytes collected transvaginally from superstimulated wood bison ( <i>Bison bison athabasca</i> )	Cervantes et al.
<i>Oryx leucoryx</i>	2022	Interspecific Nuclear Transfer Blastocysts Reconstructed from Arabian Oryx Somatic Cells and Domestic Cow Ooplasm	Ammari et al.
<i>Bison bison</i>	2012	Superovulation of north american bison with two injections of follicle stimulating hormone	Barfield and Seidel
<i>Bison bison athabasca</i>	2013	Superovulation and embryo transfer in wood bison ( <i>Bison bison athabasca</i> )	Toosi et al.
<i>Cervus elaphus</i>	2007	Multiple ovulation and embryo transfer with fresh, frozen and vitrified red deer ( <i>Cervus elaphus</i> ) embryos in Argentina.	Soler et al.
<i>Bison bison bison</i>	2013	<i>In Vitro</i> Development of Bison Embryos Using Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer	Seaby et al.
<i>Bison bison athabasca</i>	2013	<i>In Vitro</i> Development of Bison Embryos Using Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer	Seaby et al.
<i>Bison bonasus</i>	2013	<i>In Vitro</i> Development of Bison Embryos Using Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer	Seaby et al.
<i>Rucervus eldii</i>	2016	The impact of ovarian stimulation protocol on oocyte quality, subsequent in vitro embryo development, and pregnancy after transfer to recipients in Eld's deer ( <i>Rucervus eldii</i> thamin)	Thongphakdee et al.

---

Fuente: Elaboración propia.

## Resultado 2: Estado de conservación de las especies estudiadas

En la tabla 2 se presenta la clasificación de las especies analizadas según su categoría, nombre común y nombre científico, conforme a los criterios establecidos por la UICN. De acuerdo con esta clasificación, se identificaron 3 especies en riesgo, distribuidas en las categorías de *Vulnerable*, *En Peligro* y *En Peligro Crítico*, reflejando la importancia de implementar medidas de conservación efectivas. Dos de estas especies pertenecen a la familia bovidae (*Bison bison athabascae* y *Oryx leucoryx*), mientras que uno corresponde a la familia cervidae (*Rucervus eldii*) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Estado de conservación de las especies encontradas. Fuente: Elaboración propia.

Nombre común	Nombre científico	Estado de conservación
Bisonte americano de bosque	<i>Bison bison athabascae</i>	En Peligro
Orix	<i>Oryx leucoryx</i>	Vulnerable
Ciervo de Eld	<i>Rucervus eldii</i>	En Peligro

Fuente: Elaboración propia.

## Resultado 3: Técnicas de producción de embriones empleadas

Se agruparon los estudios según la técnica utilizada: FIV, MOET Y SCNT. Esto permitió analizar qué técnicas se emplean más frecuentemente en determinadas especies.

**Tabla 3.** Técnicas utilizadas en la producción de embriones.

<b>Especie</b>	<b>Técnica empleada</b>	<b>Autor(es)</b>
<i>Bison bison bison</i>	FIV	Benham et al. (2020)
<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	FIV	Iniesta-Cuerda et al. (2019)
<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	FIV	García-Álvarez et al. (2010)
<i>Dama dama</i>	FIV	Uccheddu et al. (2020)
<i>Bison bonasus</i>	FIV	Duszevska et al. (2018)
<i>Bison bison athabascae</i>	MOET	Toosi et al. (2013)
<i>Bison bison athabascae</i>	MOET	Palomino et al. (2017)
<i>Bison bison athabascae</i>	MOET	Palomino et al. (2017b)
<i>Bison bison</i>	MOET	Barfield and Seidel (2012)
<i>Cervus elaphus</i>	MOET	Soler et al. (2007)
<i>Bison bison athabascae</i>	MOET	Cervantes et al. (2017)
<i>Oryx leucoryx</i>	SNTC	Ammari et al. (2022)
<i>Bison bison bison</i>	SNTC	Seaby et al. (2013)
<i>Bison bison athabascae</i>	SNTC	Seaby et al. (2013)
<i>Bison bonasus</i>	SNTC	Seaby et al. (2013)
<i>Mazama gouazoubira</i>	SNTC	Magalhães et al. (2020)
<i>Rucervus eldii</i>	FIV/MOET	Thongphakdee et al. (2016)

Fuente: Elaboración propia

**Resultado 4: Parámetros cuantitativos sobre tasas de desarrollo embrionario**

Se identificaron 17 estudios que reportan la aplicación de técnicas de reproducción asistida en rumiantes silvestres. Las especies más representadas fueron *Bison bison athabascae* y *Cervus elaphus hispanicus*. Las técnicas utilizadas fueron la fertilización in vitro (FIV), la transferencia de embriones múltiples (MOET) y la estimulación sincrónica de la ovulación con ciclo natural (SNTC), (Figura 2).

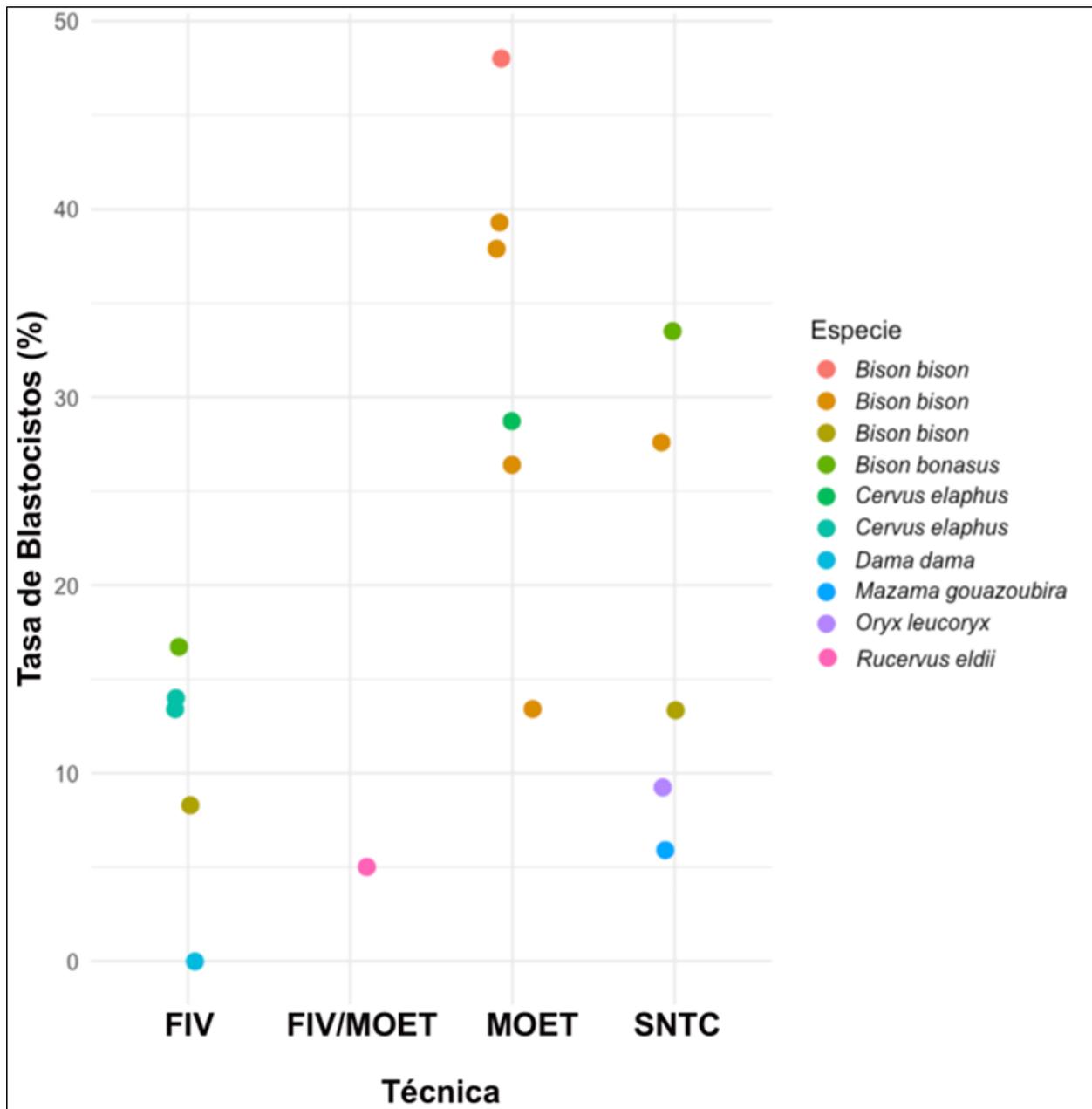
En cuanto a FIV, la tasa de blastocistos fue muy variable entre especies y estudios. En *Bison bison bison*, a partir de 7.503 ovocitos recuperados de 471 hembras, se obtuvo una tasa de blastocistos del 8,3% (Benham et al., 2020). En *Cervus elaphus hispanicus*, se reportaron tasas del 13,4% (García-Álvarez et al., 2010) y 14% (Iniesta-Cuerda et al., 2019), aunque sin detallar el número de hembras. En *Dama dama*, la tasa fue de 0% a

partir de 166 ovocitos (Uccheddu et al., 2020), mientras que en *Bison bonasus*, se alcanzó un 16,7% con solo 12 ovocitos (Duszewska et al., 2018).

Respecto a MOET, se observaron tasas de blastocistos más altas en algunas especies. En *Bison bison athabascae*, las tasas variaron entre 13,4% y 39,3%, dependiendo del estudio (Palomino et al., 2016a; 2016b; Toosi et al., 2013; Cervantes et al., 2017). En *Cervus elaphus*, se reportó una tasa del 28,7% con una tasa de mórulas del 16,4% (Soler et al., 2007).

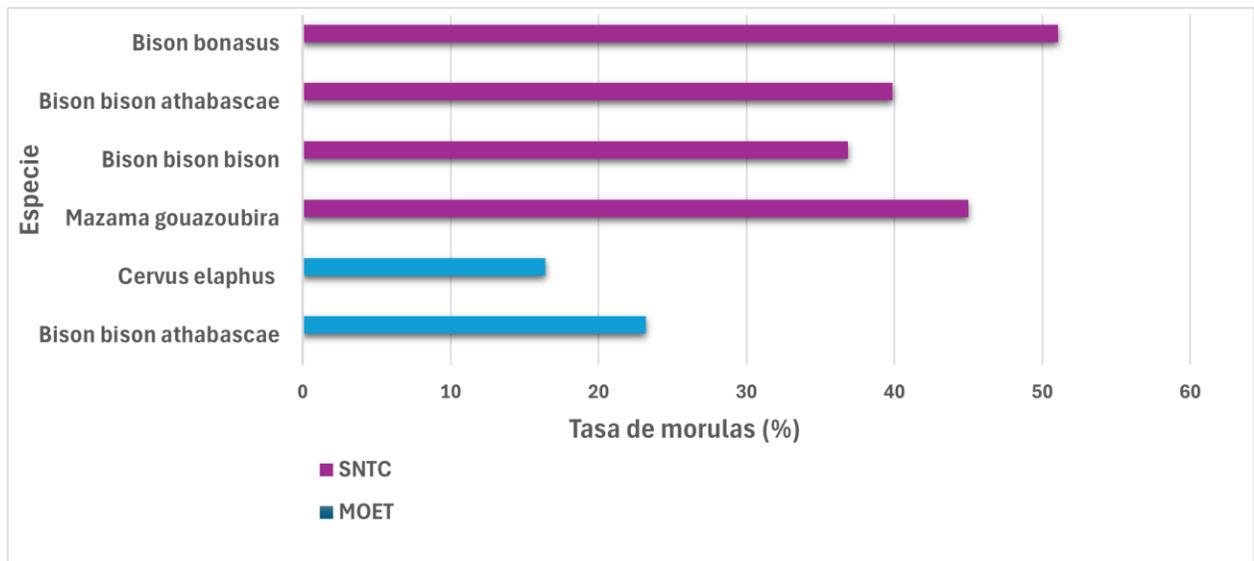
La técnica SNTC mostró un rango amplio de tasas de blastocistos, con un máximo de 33,5% en *Bison bonasus* y un mínimo del 5,9% en *Mazama gouazoubira* (Seaby et al., 2013; Magalhães et al. 2020). En *Bison bison athabascae*, se logró un 27,6% de blastocistos.

En general, MOET fue la técnica asociada con las tasas más altas de desarrollo embrionario en especies como *Bison bison* y *Cervus elaphus*, mientras que la eficiencia de FIV fue más variable y dependiente de la especie y del protocolo utilizado. SNTC. Todos los detalles se resumen en la tabla 4.



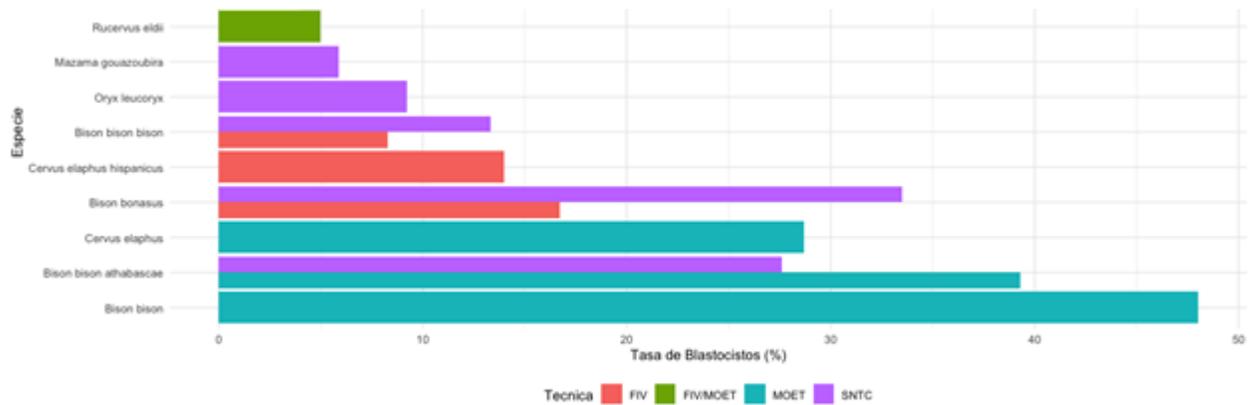
Fuente: Elaboración propia

**Figura 2:** a) Gráfico de barras que representa la distribución del número de los estudios consultados en relación a la especie. b) Distribución de las tasas de blastocistos (%) obtenidas mediante diferentes técnicas de producción embrionaria en rumiantes silvestres en peligro de extinción. Cada punto representa una observación individual por especie. Las técnicas evaluadas incluyen fecundación in vitro (FIV), transferencia de embriones múltiples tras superovulación (MOET), FIV seguida de MOET (FIV/MOET) y clonación por transferencia nuclear somática (SNTC).



Fuente: Elaboración propia

**Figura 3:** Análisis descriptivo de la tasa de mórulas (%) de cada especie analizada en relación a la técnica utilizada.



Fuente: Elaboración propia

**Figura 4:** Análisis descriptivo de la tasa de blastocistos (%) de cada especie analizada en relación a la técnica utilizada.

**Tabla 4.** Parámetros de desarrollo embrionario reportados en rumiantes silvestres.  
Fuente: Elaboración propia

Especie	Técnica	Nº hembras	Obtención de ovocitos	Tasa de mórulas (%)	Tasa de blastocistos (%)	Referencia
<i>Bison bison bison</i>	FIV	471	7503	No se menciona	8.3	Benham et al. (2020)
<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	FIV	236	No se menciona	No se menciona	13.4	García-Álvarez et al. (2010)
<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	FIV	No se menciona	694	No se menciona	14	Iniesta-Cuerda et al. (2019)
<i>Dama dama</i> ,	FIV	10	166	No se menciona	0	Uccheddu et al. (2020)
<i>Bison bonasus</i>	FIV	1	12	No se menciona	16.7	Duszewska et al. (2018)
<i>Rucervus eldii</i>	FIV/MOET	3	133	No se menciona	5	Thongphakdee et al. (2016)
<i>Bison bison athabasca</i>	MOET	50	No se menciona	23,2	13,4	Palomino et al. (2016)
<i>Bison bison athabasca</i>	MOET	20	28	No se menciona	39,3	Palomino et al. (2016b)
<i>Bison bison athabasca</i>	MOET	20	29	10.5 (exp.2)	37.9	toosi et al. (2013)
<i>Bison bison</i>	MOET	8	No se menciona	No se menciona	48	Barfield and Seidel (2012)
<i>Cervus elaphus</i>	MOET	19	122	16.4	28.7	Soler et al. (2007)
<i>Bison bison athabasca</i>	MOET	32	244	17.6 (exp.2)	26.4	Cervantes et al. (2017)
<i>Mazama gouazoubira</i>	SNTC	No se especifica	901	45	5,9	Magalhães et al. (2020)
<i>Oryx leucoryx</i>	SNTC	No se especifica	1832	No se especifica	9,23	Ammari et al. (2022)
<i>Bison bison bison</i>	SNTC	No se menciona	136	36.86	13,34	Seaby et al. (2013)
<i>Bison bison athabasca</i>	SNTC	No se menciona	105	39.86	27.6	Seaby et al. (2013)
<i>Bison bonasus</i>	SNTC	No se menciona	135	51.08	33.5	Seaby et al. (2013)

Fuente: Elaboración propia

## Resultado 5: Análisis específico de especies en categoría

### Vulnerable o En Peligro

Se extrajeron y analizaron por separado los datos correspondientes a especies en las categorías más críticas. Esto permite una evaluación específica del uso de técnicas de reproducción asistida como herramienta de conservación. Se identificaron siete estudios realizados a especies en peligro de extinción siendo seis de ellos especies de la familia bóvidos y uno de la familia cérvido. Con respecto a los resultados, se observó una variabilidad en los resultados. Con respecto a *Rucervus eldii* se empleó la combinación de técnicas entre FIV y MOET, donde se obtuvo 133 ovocitos a partir de tres hembras, pero solo un 5% en la tasa de blastocistos (Thongphakdee et al., 2016).

En contraste a aquello se contó con un mayor número de estudios y técnicas a *Bison bison athabascae*, específicamente MOET y SNTC. Las tasas de blastocistos en MOET variaron entre un 13.4% en 50 hembras y un 39.3% en 20 hembras (Palomino et al 2016; 2016b). Además, Toosi et al., (2013), que alcanzaron un 37,9%, y Cervantes et al., (2017), con un 26,4%.

SNTC también ha mostrado resultados alentadores en bisontes, con una tasa de mórulas del 39,86% y de blastocistos del 27,6% según Seaby et al., (2013 y en el caso de *Oryx leucoryx*, Ammari et al., (2022) reportaron el uso de SNTC en un gran número de ovocitos (1832), obteniendo una tasa de blastocistos del 9,23%.

**Tabla 5.** Parámetros embrionarios para especies en estado *Vulnerable* o *En Peligro*.

Fuente: Elaboración propia

Especie	Técnica	Nº hembras	Obtención de ovocitos	Tasa de mórulas (%)	Tasa de blastocistos (%)	Referencia
<i>Rucervus eldii</i>	FIV/MOET	3	133	No se menciona	5	Thongphakdee et al. (2016)
<i>Bison bison athabascae</i>	MOET	50	No se menciona	23,2	13,4	Palomino et al. (2016)
<i>Bison bison athabascae</i>	MOET	20	28	No se menciona	39,3	Palomino et al. (2016b)

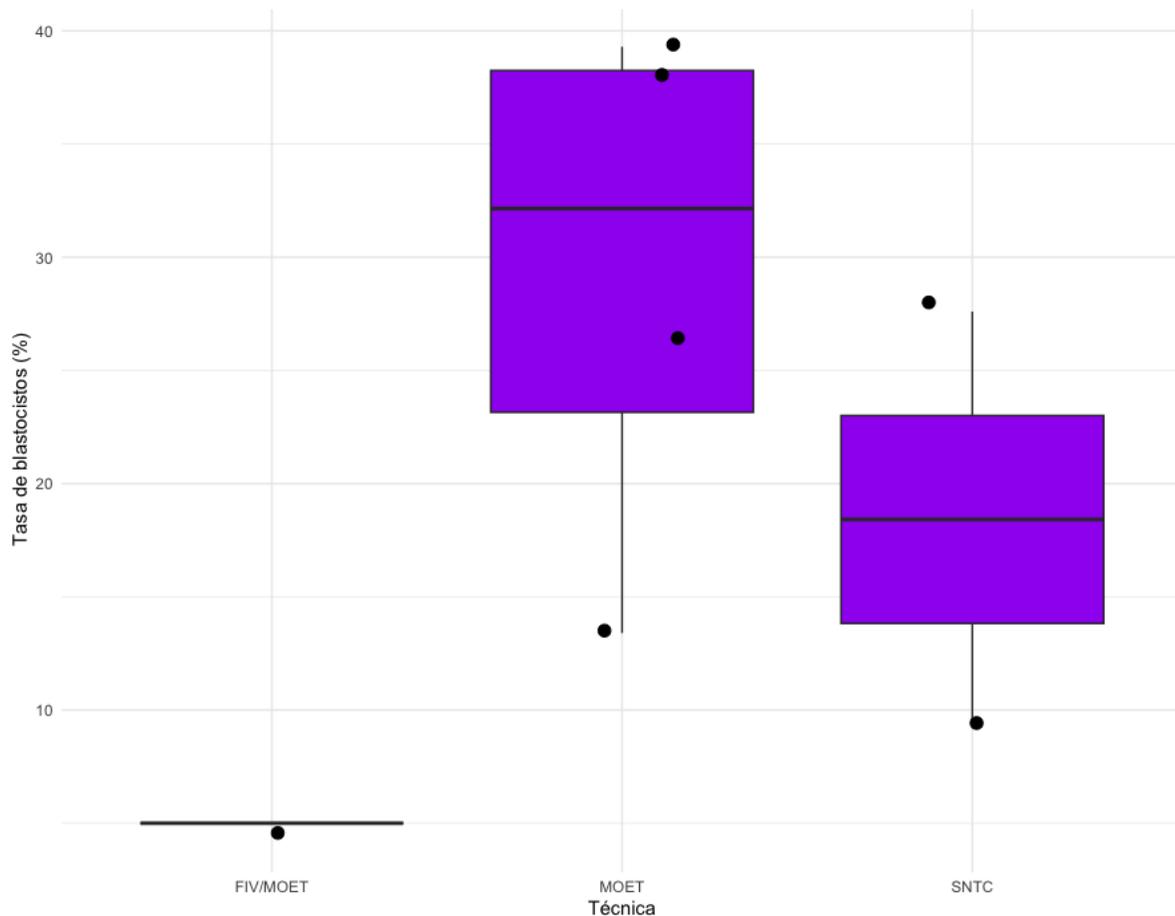
<i>Bison bison</i> <i>athabasca</i>	MOET	20	29	10.5	37.9	Toosi et al. (2013)
<i>Bison bison</i> <i>athabasca</i>	MOET	32	244	17.6	26.4	Cervantes et al. (2017)
<i>Oryx</i> <i>leucoryx</i>	SNTC	No se especifica	1832	No se especifica	9,23	Ammari et al. (2022)
<i>Bison bison</i> <i>athabasca</i>	SNTC	No se menciona	105	39.86	27.6	Seaby et al. (2013)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 6:** Estadísticas descriptivas de tasa de blastocistos (%) en especies de cérvidos en categoría de Vulnerable o En Peligro.

Técnica	n	Media	Desv. Est.	Mín.	Mediana	Máy.
FIV/MOET	1	5.0	–	5.0	5.0	5.0
MOET	4	29.3	12.0	13.4	32.2	39.3
SNTC	2	18.4	13.0	9.2	18.4	27.6

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

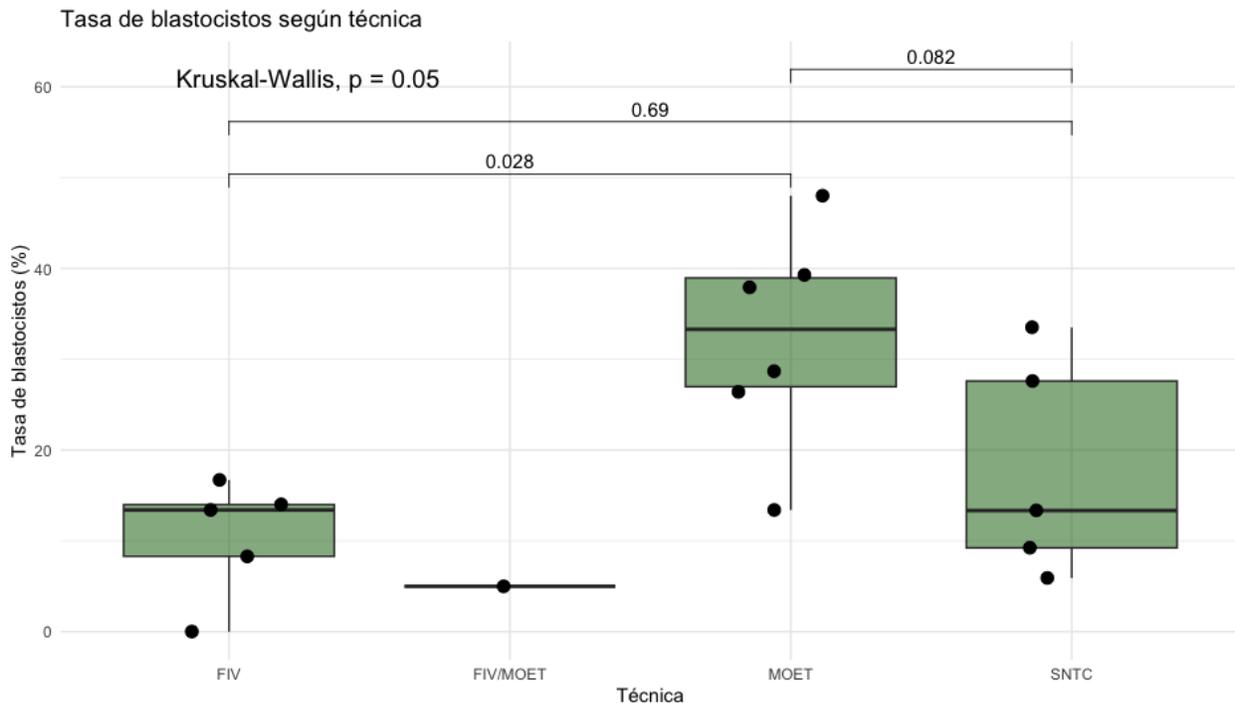
**Figura 5:** Comparativa de técnicas entre especies vulnerables o en peligro. Se observó que, la técnica MOET presenta la media más alta y la mayor consistencia en tasas de blastocistos. SNTC muestra resultados intermedios, pero con alta variabilidad. FIV/MOET se basa en un solo dato, con baja tasa de éxito. Tras el análisis, el valor  $p > 0.05$  lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas ( $p=0.235$ ).

**Objetivo 2: Comparar la eficiencia de las técnicas de producción de embriones mediante el análisis de las tasas de desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto en rumiantes silvestres en peligro de extinción.**

Se realizó la comparación de tasas de desarrollo embrionario entre técnicas utilizadas (como FIV vs. ICSI) dentro de una misma especie o entre especies similares. Este análisis no permitió identificar las técnicas más efectivas en contextos específicos y sugiere mejoras o adaptaciones de los protocolos utilizados, además de nuevos estudios a futuro.

## Comparación de la tasa de blastocistos entre las técnicas.

Al comparar las tres técnicas de manera simultánea (FIV, MOET y SNTC), se observó con el test de Kruskal Wallis un  $p = 0,05$ . Esto quiere decir que existe una diferencia significativa marginal entre las técnicas. Mientras que, cuando se realizó el test de Wilcoxon por pares es decir: FIV vs MOET, FIV vs SNTC y MOET vs SNTC) muestra que solo hay diferencias significativas en la comparación de FIV vs MOET ( $p < 0,05$ ). Además, MOET muestra una mediana de tasa de blastocistos más alta que FIV y SNTC, con una distribución más concentrada, lo que sugiere mayor eficiencia y menor variabilidad. FIV/MOET muestra una distribución más amplia, indicando mayor dispersión en los resultados. Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas, se observan tendencias que podrían ser relevantes biológicamente (Figura 6).



Fuente: Elaboración propia

**Figura 6:** Comparativa entre FIV vs MOET, MOET vs SNTC y FIV vs SNTC. Tasa de blastocistos (%) obtenida mediante distintas técnicas reproductivas: fertilización in vitro (FIV), combinación FIV/MOET, transferencia embrionaria múltiple (MOET) y transferencia nuclear somática (SNTC). Se muestran los valores individuales, la mediana y los rangos intercuartílicos. Las comparaciones estadísticas con el test global de Kruskal-Wallis ( $p=0,05$ ) y test por pares de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSIÓN

La presente revisión sistemática integró y analizó 17 estudios científicos publicados entre 2007 y 2022, que evaluaron técnicas de producción embrionaria en rumiantes silvestres en peligro de extinción. Según la clasificación de la UINC, esta categoría incluye las especies “Vulnerable”, “En Peligro” y “En Peligro Crítico” (Alfonsín & Bucetto, 2019). La mayoría de los estudios revisados se centraron en especies de cérvidos y bóvidos americanos. De acuerdo a lo recopilado (figura 1), el *Bison bison athabasca* fue la especie con mayor número de estudios disponibles (Barfield & Seidel, 2012; Cervantes et al., 2017; Palomino et al., 2016, 2016b; Seaby et al., 2013; Toosi et al., 2013).

En el año 2013, cuando esta subespecie aún se encontraba clasificada como “Amenazada”, se reportó la primera preñez lograda mediante la técnica de MOET en bisontes del bosque (*Bison bison athabasca*) (Toosi et al., 2013).

El análisis permitió identificar tendencias de investigación, comparar la eficiencia entre distintas técnicas y evaluar el estado actual de la producción embrionaria como herramienta para la conservación de estas especies. A pesar de la escasa información existente sobre la fisiología de las especies silvestres (Silva et al., 2015), esta revisión constituye un antecedente para la aplicación de técnicas reproductivas en estos animales.

Entre las técnicas evaluadas FIV, MOET y SNTC usadas en rumiantes silvestres en peligro de extinción, MOET fue la que registró la tasa más alta de blastocistos más alta registrada, alcanzando un 48%, según los estudios analizados (Barfield & Seidel, 2012). Este rendimiento podría explicarse porque en MOET a lo largo de los años, se ha invertido un gran esfuerzo en mejorar los protocolos de tratamiento de superestimulación. Los tratamientos han evolucionado desde la luteólisis natural hasta el control total del desarrollo folicular y la ovulación. Estos avances han simplificado los tratamientos de superovulación y han contribuido a la aplicación generalizada de la tecnología de transferencia de embriones en todo el mundo (Bó & Mapletoft, 2013). Debido a esto, MOET es una de las biotecnologías reproductivas más accesibles y eficientes en la

conservación de la vida silvestre debido a su menor complejidad técnica. Además, de su importancia en hembras valiosas y su idoneidad para las condiciones de campo, MOET permite recuperar múltiples embriones desde una sola hembra, maximizando el aporte genético a la población, lo que representa un valor conservacionista (Amiridis & Cseh, 2012; Mastromonaco, 2024). Esta técnica incluso puede aplicarse entre especies estrechamente relacionadas cuando no se dispone de una receptora de la misma especie (Souza et al., 2011).

En cuanto a la FIV, se han logrado avances significativos, como la obtención de blastocistos viables en *Bison bonasus*, una especie cuya categoría de conservación ha mejorado de “Vulnerable” a “Casi Amenazada” (Duszewska et al., 2018; Plumb et al., 2020). En rumiantes silvestres se ha registrado una tasa máxima de blastocistos del 16,7%, utilizando complejos cúmulos-ovocitos inmaduros (imCOC) obtenidos de una hembra *Bison bonasus* sacrificada por causas no relacionadas con la infertilidad. En este estudio, se logró con éxito el desarrollo de un embrión hasta la etapa de blastocisto, el cual fue posteriormente vitrificado. Sin embargo, una limitación importante fue que, de los 12 imCOC recuperados, solo uno alcanzó la etapa de blastocito (Duszewska et al., 2018).

Otro estudio mostró que al combinar FIV con MOET, se logró una tasa de blastocistos del 5% (Thongphakdee et al. 2016). Estas tasas, inferiores a las obtenidas usando MOET, pueden explicarse debido a que FIV sigue siendo limitada en animales silvestre, debido a las dificultades en la recolección de gametos, las respuestas ováricas inconsistentes y altas demandas técnicas del cultivo de embriones. A ello, se suma el estrés de la captura o simplemente diferencias fisiológicas entre especies (Pukazhenthil et al., 2001; Comizzoli et al., 2000).

En consecuencia, se hace necesario ampliar los estudios en FIV en condiciones de campo, donde su aplicación sigue siendo limitada. El desarrollo de biotecnologías móviles podría facilitar su implementación fuera de laboratorios especializados.

Respecto a la transferencia nuclear de células somáticas (SNTC), además de sus complejidades técnicas, no deben subestimarse sus implicancias éticas. Esta técnica ha sido un tema crítico para la opinión pública en torno al bienestar animal y el impacto sobre la diversidad genética natural. Por lo tanto, su aplicación en proyectos de conservación

actuales o futuros, requiere un sólido diálogo bioético que involucre a comunidades locales, científicas y autoridades ambientales (Hildebrandt & Holtze, 2024).

En cuanto a sus resultados, esta técnica está bajo constante perfeccionamiento. En las últimas 2 décadas se ha logrado reconstituir blastocistos de especies “En Peligro” como el Orix árabe (*Oryx leucoryx*) (Ammari et al., 2022). Esta biotecnología tiene el potencial no solo de preservar especies amenazadas, sino también, de lograr el nacimiento de un individuo ya declarado extinto, como es el caso del Bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*) en el año 2003 (Folch et al., 2009; Souza et al 2011). En Chile, a través de la transferencia heteroespecífica, utilizando fibroblastos de la oreja de un pudú (*Pudu puda*) y los ovocitos de un rumiante doméstico, se logró una tasa de blastocistos del 4% (Venegas et al., 2006).

Según la presente revisión bibliográfica, se registraron tasas de blastocistos de hasta 33,5% en rumiante silvestre (Seaby et al., 2013) y hasta 27,6% en rumiante en peligro de extinción (Seaby et al., 2013b).

Si bien el análisis estadístico no mostró diferencias significativas tras la corrección por comparaciones múltiples, se observaron tendencias que sugieren una mayor eficiencia de la técnica MOET en comparación con FIV (p.adj = 0,028) y con SNTC (p.adj = 0,082). Estas diferencias, aunque no concluyentes, podrían explicarse por el limitado tamaño muestral. Se recomienda realizar estudios con mayor poder estadístico para confirmar estos hallazgos.

A pesar de la falta de significancia estadística, MOET parece ser la técnica más prometedora en términos de eficiencia (tasa de blastocistos) para ruminantes silvestres. Ampliar el número de estudios futuros facilitará la validación de esta tendencia y contribuirá a la aplicación efectiva de estas biotecnologías en programas de conservación, tanto *ex situ* como *in situ*.

## 6. CONCLUSIONES

Tras el desarrollo de esta revisión bibliográfica y el análisis de los 17 artículos seleccionados, se identificó que la especie con más estudios publicados fue el *Bison bison athabascae*, con cinco estudios publicados, registrando tasas de blastocistos entre un 13,4% y un 39,3%, ambos estudios realizados con la técnica de MOET.

A partir de los datos recopilados, MOET se perfila como la biotecnología reproductiva más prometedora para rumiantes silvestres en peligro de extinción, mostrando una mediana de tasa de blastocistos superior a la observada con FIV y SNTC y una menor variabilidad entre los estudios, lo que sugiere mayor eficiencia y menor variabilidad biológica. Su relativa menor complejidad técnica, la posibilidad de obtener múltiples embriones por ciclo y su aplicación interespecífica, la posicionan como una técnica adecuada para condiciones de campo y programas de conservación en cautiverio.

No obstante, su éxito depende de factores como la condición fisiológica de las hembras involucradas, la experiencia del personal técnico y las condiciones de manejo. En contraste, FIV Y SNTC presentaron menores rendimientos y mayor variabilidad, atribuibles a los desafíos técnicos propios de las especies silvestres y la necesidad de infraestructura especializada. Sin embargo, la oportunidad de vitrificar embriones a través de estas técnicas representa un recurso valioso para la conservación de especies protegidas.

Finalmente, la integración de estas biotecnologías en estrategias de conservación tanto *in situ* y *ex situ* puede contribuir significativamente a mitigar la pérdida de biodiversidad y garantizar la preservación de especies rumiantes en peligro de extinción. Aunque MOET muestra una mayor eficacia, se requieren investigaciones adicionales con un mayor número de individuos y especies para validar estos hallazgos y optimizar su aplicación en contextos reales de conservación.

## 7. REFERENCIAS

- Alfonsín, M. A. L., & Bucetto, M. S. (2019). Las especies en peligro de extinción y los mecanismos para la recuperación y conservación de la biodiversidad: un estudio sobre la viabilidad de los mecanismos y las trabas burocráticas. *Lex: Revista de la Facultad de Derecho y Ciencia Política de la Universidad Alas Peruanas*, 17(23), 297-324.
- Amiridis, G., & Cseh, S. (2012). Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.009>
- Ammari, A., Al-Ghadi, M., Amran, R., Al-Malahi, N., & Alhimaidi, A. (2022). Interspecific nuclear transfer blastocysts reconstructed from Arabian oryx somatic cells and domestic cow ooplasm. *Veterinary Sciences*, 10(1), 17. <https://doi.org/10.3390/vetsci10010017>
- Andrabi, S., Maxwell, W. (2007): A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, 99, 223–243. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.07.002.
- Barfield, J.P., Seidel, G.E., 2012. Superovulation of North American Bison with two injections of follicle-stimulating hormone. *Reproduction, Fertility and Development* 25, 302–303. Barrio, J., Nuñez, A., Pacheco, L., Regidor, H.A. & Fuentes-Allende, N. 2017.
- Benham, H., McCollum, M., Nol, P., Frey, R., Clarke, P., Rhyan, J., & Barfield, J. (2020). Production of embryos and a live offspring using post mortem reproductive material from bison (*Bison bison bison*) originating in Yellowstone National Park, USA. *Theriogenology*, 160, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.022>
- Black-Decima, P., Corti, P., Díaz, N., Fernandez, R., Geist, V., Gill, R., Gizejewski, Z., Jiménez, J., Pastore, H., Saucedo, C. & Wittmer, H. 2016. *Hippocamelus bisulcus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T10054A22158895. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T10054A22158895.en>.

- Bó, G., & Mapletoft, R. (2013). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Bolton, R., Mooney, A., Pettit, M., Bolton, A., Morgan, L., Drake, G., Appeltant, R., Walker, S. L., Gillis, J. D., & Hvilsom, C. (2022). Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. *Reproduction And Fertility*, 3(3), R121-R146. <https://doi.org/10.1530/raf-22-0005>
- Cervantes, M., Palomino, J., Anzar M., Mapletoft, R., Mastromonaco, G., Adams, G., In vitro-production of embryos using immature oocytes collected transvaginally from superstimulated wood bison (*Bison bison athabasca*), *Theriogenology* (2017), doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.01.017.
- Comizzoli, P., Mermillod, P., & Mauget, R. (2000). Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 40(5), 493-504. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000113>
- Cseh, S., & Solti, L. (2000). Importance of assisted reproductive technologies in the conservation of wild, rare or indigenous ungulates. *Acta Veterinaria Hungarica*, 48(3), 313-323. <https://doi.org/10.1556/avet.48.2000.3.8>
- Duszevska, A., Gręda, P., Baraniewicz, M., Bielecki, W., Niżański, W., Partyka, A., Tracz, M., Nowak, Z., Chełmońska-Soyta, A., & Olech, W. (2018). Obtaining wisent early blastocyst in vitro is a basic for protection and creation of biodiversity for this threatened species. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(3), 818-821. <https://doi.org/10.1111/rda.13168>
- Figueirêdo, V., Melo, L., Magalhães, L., & Duarte, J. (2020). Transferência nuclear de células somáticas interespecífica (TNCSi) na conservação de cervídeos em risco de extinção. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, 44(2), 45-49.

- Folch, J., Cocero, M., Chesné P., Alabart J., Domínguez V., Cognié Y., Roche A., Fernandez-Arias A., Martia J., Sánchez P., Echegoyen E., Beckers J., Sánchez A., Vignon, X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, v.71, p.1026-1034, 2009.
- Fuentes, F., de la Calle, J., Oviedo, M., García, R., de Bulnes, A., López, A., & Montañés, J. (2004). Influencia de un protocolo MOET (ovulación múltiple y transferencia de embriones) sobre la posterior tasa de gestación de la hembra donante. In *Producción Ovina y Caprina: XXIX Jornadas Científicas. VIII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia* (p. 47). Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia SEOC.
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Berlinguer, F., Fernández-Santos, Estesó, M., Mermillod, P., Ortiz, J., Ramon, M., Pérez-Guzmán, M., Garde, J., & Soler, A. (2010). Effect of storage temperature during transport of ovaries on in vitro embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology*, 75(1), 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.011>
- Gurdon, J. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*, 4(2), 256-273. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(62\)90043-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(62)90043-x)
- Herrick, J. (2019). Assisted reproductive technologies for endangered species conservation: developing sophisticated protocols with limited access to animals with unique reproductive mechanisms. *Biology Of Reproduction*, 100(5), 1158-1170. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz025>
- Hildebrandt, T., & Holtze, S. (2024). Advanced assisted reproduction technologies in endangered mammalian species. *Reproduction In Domestic Animals*, 59(S3). <https://doi.org/10.1111/rda.14700>
- Hippocamelus antisensis. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T10053A22158621. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T10053A22158621.en>.

- Iniesta-Cuerda, M., Sánchez-Ajofrín, I., García-Álvarez, O., Martín-Maestro, A., Peris-Frau, P., Ortiz, J. A., Fernández-Santos, M. R., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2019). Influence of foetal calf serum supplementation during in vitro embryo culture in Iberian red deer. *Reproduction In Domestic Animals*, 54(S4), 69-71. <https://doi.org/10.1111/rda.13498>
- Korzekwa, A., & Kotlarczyk, A. (2021). Artificial reproductive technology (ART) applied to female cervids adapted from domestic ruminants. *Animals*, 11(10), 2933. <https://doi.org/10.3390/ani11102933>
- Locatelli, Y., Hendriks, A., Vallet, J., Baril, G., Duffard, N., Bon, N. M., Ortiz, K. M., Scala, C., Machaty, Z., Peippo, J., & Peter, A. T. (2012). Production and Manipulation of Bovine Embryos: Techniques and Terminology. *Theriogenology*, 78(5), 937-950. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.003>
- Machaty, Z., Peippo, J., & Peter, A. (2012). Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology*, 78(5), 937-950.
- Magalhães, L., Cortez, J., Bhat, M., Sampaio, A., Freitas, J., Duarte, J., Melo, L., & Freitas, V. (2020). In Vitro Development and Mitochondrial Gene Expression in Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*) Embryos Obtained by Interspecific Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cellular Reprogramming*, 22(4), 208-216. <https://doi.org/10.1089/cell.2019.0069>
- Mastromonaco, G. (2024). *si Animal Reproduction*, 21(3). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2024-0049>
- Mastromonaco, G., & Gonzalez-Grajales, A. (2020). Reproduction in female wild cattle: Influence of Seasonality on ARTs. *Theriogenology*, 150, 396-404. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.016>
- Maurel, M., Mermillod, P., & Legendre, X. (2012). Assessment LOPU-IVF in Japanese Sika deer (*Cervus nippon nippon*) and application to Vietnamese sika deer (*Cervus nippon pseudaxis*) a related subspecies threatened with extinction. *Theriogenology*, 78(9), 2039-2049. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.025>

- Mogey, R., Bell, S., O'Hanlon, J., Rowlands, T., Walker, S., & Marandola, E. The successful non-invasive endocrine monitoring of oestrous cycles in Banteng (*Bos javanicus*).
- Palomino, J., Cervantes, M., McCorkell, R., Mapletoft, R., & Adams, G. (2016). Effects of eCG and progesterone on superovulation and embryo production in wood bison. *Animal Reproduction Science*, 170, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.03.004>
- Palomino, J., Cervantes, M., McCorkell, R., Mapletoft, R., & Adams, G. (2016). *Superovulation in wood bison (Bison bison athabascae): Effects of progesterone, treatment protocol and gonadotropin preparations for the induction of ovulation*. *Animal Reproduction Science*, 167, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.001>
- Pintus, E., & Ros-Santaella, J. (2014). Assisted Reproductive Technologies in deer (*Artiodactyla, cervidae*): a review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 136-146. <https://doi.org/10.7160/sab.2014.450210>
- Plumb, G., Kowalczyk, R., & Hernandez-Blanco, J. (2020). *Bison bonasus*. The IUCN red list of threatened species 2020: e. T2814A45156279.
- Pukazhenthil, B., Wildt, D., & Howard, J. (2001). The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *PubMed*, 57, 423-433. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11787186>
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Roldán E, Garde J. Los retos medioambientales del siglo XXI: La conservación de la biodiversidad en España. *Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción*. Monserrat Goendio. Fundación BBVA. 2004; 307–338.
- Samiec, M., Romanek, J., Lipiński, D., & Opiela, J. (2019). Expression of pluripotency related genes is highly dependent on trichostatin A-assisted epigenomic modulation of porcine mesenchymal stem cells analysed for apoptosis and subsequently used for generating

cloned embryos. *Animal Science Journal*, 90(9), 1127-1141.  
<https://doi.org/10.1111/asj.13260>

Schiewe, M., Bush, M., Phillips, L., Citino, S., & Wildt, D. (1991). Comparative aspects of estrus synchronization, ovulation induction, and embryo cryopreservation in the scimitar-horned Oryx, Bongo, Eland, and Greater Kudu. *The journal of experimental zoology*, 258(1), 75-88. <https://doi.org/10.1002/jez.1402580109>

Seaby, R., Alexander, B., King, W., & Mastromonaco, G. (2013). In Vitro Development of Bison Embryos Using Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer. *Reproduction In Domestic Animals*, 48(6), 881-887. <https://doi.org/10.1111/rda.12180>

Silva, A. R., Lima, G., Peixoto, G., & Souza, A. L. (2015). Cryopreservation in mammalian conservation biology: current applications and potential utility. *Research And Reports In Biodiversity Studies*, 1. <https://doi.org/10.2147/rrbs.s54294>

Silva-Rodríguez, E., Pastore, H. & Jiménez, J. 2016. Pudu puda. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T18848A22164089. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T18848A22164089.en>. Accessed on 22 November 2023.

Soler, J., Mucci, N., Kaiser, G., Aller, J., Hunter, J., Dixon, T., & Alberio, R. (2007). Multiple ovulation and embryo transfer with fresh, frozen and vitrified red deer (*Cervus elaphus*) embryos in Argentina. *Animal Reproduction Science*, 102(3-4), 322-327. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.024>

Souza, J., Batista, R., Melo, L., & Freitas, V. (2011). Reproductive biotechnologies applied to the conservation of endangered ruminant—Past, present and future. *Rev. Port. Cienc. Vet*, 106, 31-38.

Thongphakdee, A., Berg, D., Tharasanit, T., Thongtip, N., Tipkantha, W., Pankong, C., Thongtainan, D., Noimoon, S., Maikew, U., Kajornklin, N., Siriaroonrat, B., Comizzoli, P.,

Kamolnorrnanarth. S. The impact of ovarian stimulation protocol on oocyte quality, subsequent in vitro embryo development, and pregnancy after transfer to recipients in Eld's deer (*Rucervus eldii thamin*), *Theriogenology* (2017), doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.12.021

Thundathil, J., Whiteside, D., Shea, B., Ludbrook, D., Elkin, B., & Nishi, J. (2007). Preliminary assessment of reproductive technologies in wood bison (*Bison bison athabasca*): Implications for preserving genetic diversity. *Theriogenology*, 68(1), 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.020>

Toosi, B., Tríbulo, A., Lessard, C., Mastro Monaco, G., McCorkell, R., & Adams, G. (2013). Superovulation and embryo transfer in wood bison (*Bison bison athabasca*). *Theriogenology*, 80(5), 542-551. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.020>

Uccheddu, S., Pintus, E., Garde, J., Fleba, L., Muzzeddu, M., Pudda, F., Bogliolo, L., Strina, A., Nieddu, S., & Ledda, S. (2020). Post-mortem recovery, in vitro maturation and fertilization of fallow deer (*Dama dama*, Linnaeus 1758) oocytes collected during reproductive and no reproductive season. *Reproduction In Domestic Animals*, 55(10), 1294-1302. <https://doi.org/10.1111/rda.13773>

Venegas, F., Guillomot, M., Vignon, X., Servely, J., Audouard, C., Montiel, E., Bourhis, D., Perón, S., Soto, P., & Rojas, M. (2006). Obtainment of Pudu (*Pudu pudu*) deer Embryos by the Somatic Nuclear Transfer Technique. *International Journal Of Morphology*, 24(2). <https://doi.org/10.4067/s0717-95022006000300026>

Wilmut, I., Schnieke, A., McWhir, J., Kind, A., & Campbell, K. (2007). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning and Stem Cells*, 9(1), 3-7. <https://doi.org/10.1089/clo.2006.0002>