



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



Transferencia de Embriones en Bovinos. Revisión

SERVICIO PROFESIONAL QUE PRESENTA:

JESUS ARRIAGA VALLADARES

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESORES:

**DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO
MC. ALEJANDRA M MARIN AGUILAR**

Tarímbaro, Michoacán; Julio, 2010



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Transferencia de Embriones en Bovinos. Revisión

SERVICIO PROFESIONAL QUE PRESENTA:

JESUS ARRIAGA VALLADARES

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Tarímbaro, Michoacán; Julio, 2010

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Ing. Rodolfo Arriaga Cabrera, Ing. Ma. Del Carmen Valladares Campos por guiarme en mi vida y apoyarme en todo.

Agradezco a mis hermanas, L.H.T. Tzetzangari Arriaga Valladares, L.E. Lol-Be Arriaga Valladares por apoyarme y confiar en mí.

Agradezco a mi esposa Ivonne Molina Torres y a mi hijo, Jesús Haidar Arriaga Molina por estar conmigo en los momentos más difíciles y darme fuerzas para seguir adelante.

Agradezco a mi asesor el Dr. José Herrera Camacho por sus enseñanzas y su apoyo brindado.

INDICE

	Pagina
1.INTRODUCCION	1
2.HISTORIA Y SITUACION ACTUAL DE LA OVULACION MULTIPLE Y LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	4
3. SELECCIÓN DE DONADORAS Y RECEPTORAS	6
4. SUPEROVULACIÓN	8
5. TÉCNICAS DE COLECCIÓN DE EMBRIONES	19
6. MEDIOS DE COLECCIÓN Y MANTENIMIENTO	23
7. BÚSQUEDA Y MANIPULACIÓN DE LOS EMBRIONES	26
8. IDENTIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES	28
9. CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES	30
10. CONGELACIÓN DE EMBRIONES	33
11. SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS	41
12. TÉCNICAS TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS	47
13. REFERENCIAS	53

1. INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones es una técnica por la cual los embriones son colectados de una hembra donante y transferidos a una hembra receptora que gesta y pare a los productos.

Este proceso requiere el uso de gonadotrofinas para inducir superovulación en la donadora y sincronizar el ciclo estral de estas con el de las receptoras para que manifiesten celo al mismo tiempo.

Al principio de los años 70 comenzó el gran interés comercial en la transferencia de embriones en el bovino y en el año de 1973 se realizó la primera transferencia exitosa de un embrión congelado y hoy día se realizan cientos de miles de obtenciones y transferencias en bovinos anualmente en todo el planeta. En bovinos el procedimiento es completamente no quirúrgico y los embriones se pueden mantener almacenados indefinidamente mediante criopreservación.

Cuadro 1. Ventajas y desventajas de la Ovulación Múltiple Transferencia de Embriones.

Ventajas	Desventajas
<ol style="list-style-type: none"> 1. Incrementar la producción de hembras genéticamente superiores. 2. Recuperación genética de animales accidentados, o enfermos permanentes de los que 3. pudieran obtenerse embriones antes de que el animal muera. 4. Diagnóstico, tratamiento y recuperación de las funciones reproductivas de hembras con 5. infertilidad de origen no genético. 6. Control y prevención de enfermedades infecciosas. 7. Importación y exportación. 8. Maximizar el uso de semen de alto valor. 9. Ayudar a la aclimatación de ciertas razas a distintos medio ambientes. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Costes operacionales. 2. Coste de las receptoras. 3. Entrenamiento de los técnicos e instalaciones. 4. Falta de predicción de resultados: <ol style="list-style-type: none"> a) número de embriones transferibles por vaca b) número de gestaciones

El procedimiento de la TE involucra una serie de pasos sencillos que deben ser llevados a cabo eficientemente para lograr resultados óptimos. Los principales son:

- Selección de donadoras, sementales y receptoras
- Superovulación e inseminación de las donadoras

- Sincronización estral donadora - receptoras
- Recolección y evaluación embrionaria
- Congelación y descongelación embrionaria
- Transferencia a la receptora
- Diagnóstico de gestación

2. HISTORIA Y SITUACION ACTUAL DE LA OVULACION MULTIPLE Y LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La OMTE, es una biotecnología nueva, ya que existen datos que en 1980, Walter Heape transfirió embriones de 4 células de una coneja de raza Angora a una de raza Belga inseminada, donde resulto el nacimiento de cuatro gazapos de la raza Belga y dos de la raza angora (Betteridge, 1981; 2003), sin que se reportaran eventos posteriores en mamíferos hasta los años 20's, cuando diferentes investigadores reportaron la técnica de transferencia de embriones en conejos. Posteriormente, Warwick y colaboradores realizaron durante los años 30's y 40's un trabajo considerable sobre la transferencia de embriones en ovinos y caprinos, y fue Umbaugh el primero que reporto el primer evento de TE en bovinos en 1949, el obtuvo cuatro preñeces de embriones bovinos transferidos, pero todas las receptoras abortaron antes de que la gestación llegara a término (Mapletoft y Hasler, 2005). En 1951, Willet y colaboradores lograron el nacimiento del primer becerro de un embrión de 5 días de edad obtenido del rastro. Posteriormente, Rowson y colaboradores en Cambridge Inglaterra desarrollaron la técnica de TE que posteriormente seria de uso comercial.

La TE llego a México en los años 70's. se inicia con la TE y comenzó el gran interés comercial en la transferencia de embriones en el bovino y en el año de 1973 se realizó la primera transferencia exitosa de un embrión congelado y hoy día se realizan cientos de miles de obtenciones y transferencias en bovinos anualmente en todo el planeta. En bovinos el procedimiento es completamente no quirúrgico y los embriones se pueden mantener almacenados indefinidamente mediante criopreservación (Ávila, 2009).

La TE es una industria que ha crecido rápidamente en los últimos años, tanto en el número de profesionales en el área como en el número de donadoras que han sido sometidas al proceso de colecta. Al respecto, Seidel (1981) reportó que en 1979, más de 17000 preñeces en los Estados Unidos resultaron de la TE. Recientemente, Thibier (2003) reportaron que en el año 2002, un total de 538 312 embriones fueron transferidos en todo el mundo. Norteamérica sigue siendo el centro de la actividad comercial de la TE, con más de 42 000 donadoras superovuladas y más de 190000 embriones transferidos (35% de los embriones transferidos mundialmente). No obstante, la OMTE en los EUA actualmente se encuentra estática o en declive, lo que ha representado una oportunidad de expansión en América del Sur, que aportó el 22% de los embriones transferidos en todo el mundo en el año 2002, mientras que Europa y Asia reportaron alrededor del 17% de los embriones transferidos en el 2002 (Thibier, 2003).

Brasil, es quizá uno de los países sudamericanos donde la actividad de la OMTE, representa una actividad económica importante, según el último reporte en el año 2007, de la Sociedad Brasileña de Tecnología de Embriones (Sociedade Brasileira de Tecnología de Embrões (SBTE, 2007), donde a pesar de la creciente producción de embriones in vitro se obtuvieron 70000 embriones in vivo, lo que representa alrededor de 15000 ovulaciones múltiples al año (Sa Filho et al., 2010). Estos resultados colocan a Brasil en el escenario mundial de la producción de embriones. En México, a pesar de los esfuerzos realizados por introducir la técnica de ovulación múltiple y transferencia de embriones, han resultado poco fructíferos ya que solamente una pequeña parte de los productores bovinos del país la utilizan de manera cotidiana, quedando solamente en manos de los productores de pie de cría o ganado de registro que comercializan embriones o bien semen de animales valiosos. Los estados donde se utiliza la OMTE se localizan en el sureste (Veracruz, Chiapas y Yucatán) y los del norte (Tamaulipas y Sinaloa), mientras que

la ganadería del centro del país, en el mejor de los casos hace uso de la Inseminación artificial.

3. SELECCIÓN DE DONADORAS Y RECEPTORAS

a) Donadoras

En un programa de OMTE, la elección de las hembras donadoras debe realizarse con base en las características genotípicas que expresen el mejor fenotipo de las hembras en un ambiente dado, no obstante, cada ganadero tiene sus propias razones para la selección de sus donantes, las cuales son a menudo más subjetivas que genéticas. En realidad el factor económico deberá ser el más importante en el programa de transferencia embrionaria, y por lo tanto al conseguir resultados óptimos se conseguirán reducir los costos inmediatos, pero subsidiariamente al hacer una buena elección desde el punto de vista genético los costes se reducirán también en el futuro. Por tanto la selección de la vaca donante es un evento crítico del cual depende el éxito del programa.

Los criterios generales para la selección de las donadoras son los siguientes:

1. Estado sanitario de la donante y la explotación.
2. Características genéticas de importancia económica.
3. Ciclos estrales regulares.
4. Sin problemas patológicos, en especial las patologías reproductivas y las asociadas al postparto.
5. Sin enfermedades de transmisión genética
6. Entre 3 y 10 años de edad, dependiendo de la raza y tipo de explotación

b) Receptora

La receptora es el complemento fundamental y determinante para el éxito del programa de transferencia embrionario.

Si la vaca o vaquilla no tiene una condición corporal de 3-4 (escala de 1-5) durante el proceso o está en pérdida de peso, existe alta probabilidad de que no haya éxito.

Características de la receptora ideal:

1. Si es cruzada, que tenga menos del 75% de encaste cebuino, y que posea
2. cruza con línea lechera, temperamento tranquilo y evidente amplitud pélvica
3. Talla media a grande.
4. Que haya parido sin dificultad y destetado la cría de buen tamaño y peso.
5. Joven y libre de enfermedades infectocontagiosas.
6. Temperamento tranquilo.
7. En franca ganancia diaria de peso

(Ávila GJ, Bailon BA.2009).

4. SUPEROVULACIÓN

El objetivo de los tratamientos superovulatorios en las vacas es obtener el máximo de embriones fertilizados y de la calidad transferible con alta probabilidad de producir gestaciones. Sin embargo la asincronía ovárica y las variaciones en las respuestas al tratamiento utilizado para la súper estimulación ovárica, es el principal factor limitante en la transferencia embrionaria para obtener una mejor producción de embriones transferibles para hacer costeaable esta práctica.

Existen varios ejemplos de las respuestas superovulatorias de revisiones de programas experimentales y comerciales de transferencia embrionaria (T.E.) y su reporte incluye el ganado de carne 6.2 embriones transferibles colectados de cada vaca donadora; sin embargo, 24% de las colectas no producen embriones viables, 64% de las donadoras producen pocos embriones transferibles y solo el 30% de las colectas o lavados producen 70% de los embriones. Estos resultados reportados, revelan que existe un alto grado de valores impredecibles en la respuesta superovulatoria. El control de las ondas foliculares presenta una nueva alternativa y una nueva luz para mejorar y reducir estas variaciones.

La superovulación (SPO) es un área que requiere estricta atención y cuidado. Las investigaciones realizadas en los últimos años no han podido solucionar todavía la variabilidad de la respuesta superovulatoria en la vaca. Tradicionalmente se dice que las donantes van a responder si la superovulación se inicia entre los días 8 y 14 del ciclo estral. La experiencia nos indica que los días 8, 9, y 10 del ciclo son los más propicios para iniciar los tratamientos SPO, debido a que en estos días se produce el comienzo de la segunda onda de desarrollo folicular.

La vaca donante recibe una dosis luteolítica de PGF a las 48 h de comenzado el tratamiento superovulatorio con gonadotrofinas y regularmente presenta celo a las 36 a 48 h después de aplicada la PGF_{2α}.

Las receptoras deberán ser tratadas con PGF_{2α} de 18 a 24 h antes que las donantes de manera que el celo se presente en forma sincrónica entre ellas. Es aconsejable detectar el celo de las receptoras desde las 12 a 24 h después de la administración de PGF_{2α}, y las donantes desde las 36 h post- PGF_{2α}.

Normalmente, las vacas donadoras entraran en celo a las 36 a 48 h post- PGF_{2α}, pero si no hay signos de celo se realizan las inseminaciones a las 60 y 72 h post PGF_{2α}. En nuestra experiencia, vacas que entran en celo un día más tarde, deben ser re-inseminadas pero normalmente van a dar una respuesta pobre (uno o dos CL). Por el contrario, las que expresan celo en el momento esperado o un poco antes va a tener una respuesta aceptable. Por lo general, cuando los signos de celo se presentan antes de lo previsto (no más de 24 h), las inyecciones se pueden suspender y se realiza la Inseminación Artificial (IA) a las 12 y 24 h de iniciado el estro.

Hay divergencia en cuanto al número de inseminaciones y la cantidad de semen requerido. Algunos grupos recomiendan el uso de dos dosis de semen en cada inseminación. A su vez, otros no han encontrado diferencia y han indicado que una sola inseminación a las 18 o 24 h post-celo es suficiente. El procedimiento de elección es la detección de celo e inseminación con semen de buena calidad a las 12 y 24 horas post-celo ó 60 a 72 horas post- PGF_{2α}.

Algunos trabajos recomiendan el uso de GnRH, LH, HCG durante el estro. Estos tratamientos han demostrado ser de utilidad en vacas donantes con problemas en la ovulación (vacas que han estado con quistes foliculares, o vacas con gran

cantidad de folículos anovulatorios en tratamientos previos, etc.). Pero no se ha encontrado ningún beneficio en su utilización de forma rutinaria.

Las gonadotrofinas más utilizadas en la actualidad son: 1) extractos de pituitaria conteniendo FSH y LH; 2) gonadotrofina coriónica equina (eCG), también llamada PMSG; y 3) gonadotrofina menopáusica humana (hMG).

Lammoglia MA (2010).

Extractos de hipófisis anterior:

a) Ovagen (ICP, New Zealand) FSH purificada de origen ovino. El envase contiene 17,6 mg. NIADDK-FSHo, equivalentes a 20 UI de NIH-FSF-S1

b) Folltropin-V (Vetrepharm Inc., Canada). El Folltropin-V es un extracto pituitario porcino al que se le ha extraído aproximadamente el 80% de la LH. Se presenta en envases conteniendo un equivalente a 700 UI de FSH, en 20 ml de diluyente. Puede ser administrado tanto en esquemas con dosis decrecientes como constantes, durante 4 ó 5 días. Se inyecta PGF_{2α} a las 48 h (tratamiento de 4 días) o a las 72 horas (tratamiento de 5 días) de iniciado el tratamiento, sin existir cambios significativos en la respuesta superovulatoria.

c) Pluset (Calier, España) es un extracto pituitario porcino con una relación 1:1 entre FSH/LH. El envase contiene 2 frascos con 500 UI de FSH y LH cada uno, y 20 ml. de disolvente.

d) Stimufol (Merial, Francia): FSH purificada conteniendo 500µg de FSH y 100µg de LH, y 10 ml. de disolvente (10 µg equivalen a 1mg de NIDDKD-FSHp)

Broadbent PJ, Stewart M, Dolman DF. (1991.)

DOSIS DE FSH

Este es un tema con mucha controversia debido a que existe una gran diversidad en el número de embriones viables obtenidos por cada lavado. Parte de la variabilidad en el número de embriones colectados depende de la calidad y dosis de FSH utilizada (Murphy et al., 1984), y también puede ser afectada por la raza, estado productivo y edad del animal. La dosis inicial que utilizo para ganado *Bos taurus* adulto en un protocolo de superovulación es de 400 mg de FSH utilizando el medicamento Folltropin.

Cuadro 2. Dosis de FSH en ganado adulto *Bos taurus*

DIA	AM	PM	TOTAL
1	80 mg (4.0 ml)	80 mg (4.0 ml)	160 mg (8.0 ml)
2	60 mg (3.0 ml)	60 mg (3.0 ml)	120 mg (6.0 ml)
3	40 mg (2.0 ml)	40 mg (2.0 ml)	80 mg (4.0 ml)
4	20 mg (1.0 ml)	20 mg (1.0 ml)	40 mg (2.0 ml)
TOTAL	200 mg (10 ml)	200 mg (10 ml)	400 mg (20 ml)

Existen razas como la Simental, Fleckvieh, Montbeliarde y algunas Cebuinas (Nelore) que son sumamente sensibles a la hormona folículo estimulante (FSH) y son necesarias dosis muy bajas para una mejor respuesta ya que dosis elevadas producen malos resultados debido a una sobre estimulación ovárica (Mapletoft et al., 2002). La dosis inicial recomendada para estas razas es de 240 mg de FSH repartido en dosis descendente por cuatro días am-pm (Cuadro 3).

Cuadro 3. Dosis de FSH en ganado con hipersensibilidad

DIA	AM	PM	TOTAL
1	50 mg (2.5 ml)	50 mg (2.5 ml)	100 mg (5.0 ml)
2	40 mg (2.0 ml)	40 mg (2.0 ml)	80 mg (4.0 ml)
3	20 mg (1.0 ml)	20 mg (1.0 ml)	40 mg (2.0 ml)
4	10 mg (0.5 ml)	10 mg (0.5 ml)	20 mg (1.0 ml)
TOTAL	120 mg (6.0 ml)	120 mg (6.0 ml)	400 mg (12.0 ml)

Las donadoras jóvenes son muy sensibles a la FSH y es recomendable iniciarlas con una dosis baja. Recomiendo iniciar becerras jóvenes con 200 mg o 240 mg de FSH. Después del primer lavado con la dosis inicial se valora la respuesta de la donadora. Si la respuesta fue favorable se queda la dosis donde utilizada. Si la respuesta no fue favorable hay dos maneras de solucionarlo en el próximo lavado:

1) Si la donadora se sobre estimulo se necesita bajar la dosis dependiendo de la respuesta. Si tenía más de 15 Cuerpos Lúteos (CLs) en cada ovario se puede reducir hasta 100 mg en el protocolo de FSH. Si fue menor a 15 CLs por ovario se puede reducir solo 50 mg, ya que es común que en vacas sobre estimuladas se encuentren en la colecta de embriones un gran número de óvulos o muy pocos embriones. Es posible también no encontrar óvulos ni embriones en vacas muy sobre estimuladas.

2) Si la donadora tuvo muy baja respuesta en cuanto al número de CLs y embriones encontrados se puede aumentar la dosis. Si fueron menos de 3

embriones se puede subir la dosis hasta 100 mg si fueron cerca de 5 embriones subirla a 60 mg.

Cuadro 4. Dosis de Follitropin para diferentes razas, pesos y edades en ganado bovino.

Dosis	Tipo de ganado
14 a 20 mg	Novillas
20 a 24.5 mg	Novillas y ganado cebuino
30 mg	Vacas adultas (Holstein)
35 mg	Vacas adultas muy grandes y pesadas.

Lammoglia MA (2010).

Gonadotrofina Coriónica de yegua preñada (eCG)

La eCG es una glicoproteína compleja con actividad de FSH y de LH. Tiene una vida media aproximada de 40 horas en la vaca y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea. Por esta razón, normalmente se administra en una sola dosis, seguida por PGF_{2α} 48 h después. La prolongada vida media de la eCG provoca algunos problemas originados por la permanente estimulación ovárica: como folículos que no ovulan, perfiles endocrinos anormales (altos niveles de estrógeno) y embriones de mala calidad.

Estos problemas se contrarrestan en gran medida con la administración de antisuero anti-eCG o anticuerpos monoclonales anti-eCG en el momento de la primera inseminación. Las dosis de eCG recomendadas oscilan entre 1500 a 3000

UI por animal, usándose generalmente 2500 UI en una inyección intramuscular. La PMSG es producida por varios laboratorios, el más popular es Intervet (Holanda). Fuentes S. (2000.)

Tratamientos superovulatorios

Al plantearse realizar un tratamiento superovulatorio a una donante son muchos los factores que hay que tener en cuenta, desde la raza, la edad, el estado fisiológico, el intervalo postparto, la condición corporal, etc.; además de otros factores ligados al rebaño, como el manejo, el estrés y el ganadero. Por esto existen numerosos protocolos de tratamientos superovulatorios sobre la base de diferentes hormonas gonadotrofinas, sus utilidades solas o acompañadas por progestágenos u otras hormonas y así será su duración y su efectividad.

Ninguno de los tratamientos ni de las hormonas garantiza una respuesta satisfactoria en todos los casos, así pues la elección del protocolo, hormona y dosis, dependerá del animal en cuestión y de sus circunstancias particulares.

Para favorecer la respuesta superovulatoria en cuanto a la cantidad y calidad de los embriones obtenidos es importante eliminar el folículo dominante al inicio del tratamiento, bien sea por medios mecánicos mediante su punción, su aspiración o por la ablación de la totalidad de los folículos presentes en los ovarios mediante un ecógrafo; o por medios farmacológicos, que mediante la administración, estrógenos, en especial el 17β estradiol y el benzoato de estradiol, inducen la regresión del folículo dominante al comienzo de su actividad. Otros estrógenos como el cipionato de estradiol están es estudio.

Algunos de los protocolos de superovulación se describen a continuación

Cuadro 5. Tratamientos superovulatorios tradicionales

Día	Donadoras				Receptoras
	PMSG		FSH		
	AM	PM	AM	PM	AM
0	2500 UI		FSH	FSH	
1			FSH	FSH	PGF _{2α}
2	PGF _{2α}		FSH + PGF _{2α}	FSH	
3			FSH	FSH	
4	CELO	IA + NEUTRA- PMSG	CELO	IA	OBSERVAR CELOS
5	IA		IA		
11		COLECTA		COLECTA	TRANSFERENCIA

Cuadro 6. Tratamiento tradicional de superovulación con dispositivos de liberación de Progesterona y 17β estradiol o Benzoato de Estradiol (Protocolo americano)

	DONADORAS		RECEPTORAS		DONADORAS		RECEPTORAS
DI A	Ecg	FSH		DI A	eCG	FSH	
0	AM: Progestágeno + P ₄ (IM) + 5 mg de E ₂			0	AM: Progestágeno + P ₄ (IM) + 5 mg de E ₂		
4	AM: eCG (2500 UI)	AM: FSH PM: FSH		5	AM: eCG (2500 UI)	AM: FSH PM: FSH	
5		AM: FSH	AM:	6		AM: FSH	AM:

Jesús Arriaga Valladares

		PM: FSH	PGF _{2α}			PM: FSH	PGF _{2α}
6	AM: PGF _{2α} PM: Retirar progestágeno	AM: FSH + PGF _{2α} PM: FSH + Retirar progestágeno		7	AM: PGF _{2α} PM: Retirar progestágeno	AM: FSH + PGF _{2α} PM: FSH + Retirar progestágeno	
7		AM: FSH PM: FSH		8		AM: FSH PM: FSH	
8	AM: Celo + IA PM: IA + Neutra-eCG	AM: Celo + IA PM: IA	AM: Observar Celos	9	AM: Celo + IA PM: IA + Neutra-eCG	AM: Celo + IA PM: IA	AM: Observar Celos
9	AM: IA	AM: IA		10	AM: IA	AM: IA	
15	Colecta	Colecta	Transferencia	16	Colecta	Colecta	Transferencia

Si se usan progestágenos, los más habituales son: CRESTAR, PRID, CIDR-B O EAZI-BRED se denomina Día 0 al día en que el progestágeno es colocado, sin importar en que día del ciclo en que se encuentra la donante.

Sa Filho MF, Martins CM, Sales SJN, Ferreira MR, Baruselli SP. (2010).

Protocolo Brasileiro

Este protocolo fue propuesto por el Baruselli (Bo et al., 2002 ; Barros et al., 2005; Baruselli et al., 2006;). Es similar a los anteriores. Sin embargo, se ha desarrollado para inseminar las donadoras a tiempo fijo es decir no hay necesidad de detectar calores por lo que lo hace probablemente el más práctico de todos los protocolos (Cuadro 7). Baruselli reporto 9,983 lavados utilizando el protocolo a tiempo fijo con un promedio de 5.6 embriones transferibles por lavado.

CUADRO 7. Protocolo brasileiro para superovulación en ganado bovino.

DIA	AM	PM
0	Implante + benzoato de estradiol (2 mg)+ progesterona (50 mg)	
4	FSH	FSH
5	FSH	FSH
6	FSH + PGF _{2α}	FSH + PGF _{2α}
7	FSH	FSH+REMOVER EL IMPLANTE
8	LH o GnRH	IATF
9	IATF	
15	LAVADO	

Lammoglia MA (2010).

Protocolo COMBO

Este protocolo es una combinación de varias hormonas auxiliares en reproducción. Por ejemplo se incorpora la utilización de la hormona llamada somatotropina bovina Recombinante conocida comercialmente con el nombre

de Lactotropina (500 mg; Elanco) o Boostin (Schering-plough; G 320 mg y S 500 mg). La idea de usar somatotropina bovina es incrementar la respuesta folicular a la hormona FSH.

Este protocolo también manipula el ciclo estral bovino para inducir las donadoras a un primer calor que se conoce como calor base. Cuatro días después del calor base se aplica somatotropina bovina, dos días después se aplica estradiol 17β (5 mg), progesterona (50 mg) y se pone el dispositivo de progesterona (Bo et al., 1995). El día 10 del ciclo se inicia el protocolo de FSH que termina el día 13 del ciclo inyectando FSH y PGF_{2α} a.m. y p.m.

Además en la última inyección de FSH y PGF₂ también se retira el implante (Cuadro 8). El calor se manifiesta generalmente a las 36 horas de retirar el implante. Es recomendable palpar los ovarios de las donadoras el día 9 del ciclo estral a partir del calor base o un día antes de iniciar el protocolo de FSH. Las donadoras que presenten cuerpo lúteo (Mapletoft et al., 2002) continuarán el programa de embriones. Esto es por si alguna de las donadoras presentó un calor falso como calor base quedará fuera del programa y de esta manera se garantiza un poco más la respuesta de las donadoras.

CUADRO 8. Protocolo combo para superovulación en ganado bovino.

DIA	AM	PM
0	IMPLANTE + ESTRADIOL 17β + PGF _{2α}	
7	RETIRAR IMPLANTE + PGF _{2α}	
8	2.5 mg ESTRADIOL 17β	
13	SOMATOTROPINA	
15	IMPLANTE + ESTRADIOL 17β (5 mg) +	

	PROGESTERONA (50 mg)	
19	FSH	FSH
20	FSH	FSH
21	FSH	FSH
22	FSH + PGF _{2α}	FSH + PGF _{2α} + REMOVED IMPLANTE
24	CALOR IA UNA DOSIS	CALOR IA DOS DOSIS
25	IA UNA DOSIS	
32	LAVADO	

Recientemente se están ensayando con buenos resultados la simplificación de los tratamientos, reduciendo el número de inyecciones de FSH a dos (dosis partida) o una sola, administrada bajo la escápula (en animales en buen estado de carnes) o vehiculada en PVP, aceites, etc., incluso puede ser expendida por pequeñas bombas osmóticas subcutáneas.

A pesar de los recientes e importantes avances logrados en el campo de la fisiología reproductiva del bovino, los factores inherentes al animal donante sólo están parcialmente aclarados. Otros factores son el estado nutricional, la historia reproductiva, la edad, la estación del año, la raza, el estado ovárico en el momento del tratamiento y efecto de repetición de tratamientos superovulatorios. Atendiendo a todo esto se pueden simplificar los procedimientos, mejorar las respuestas y reducir la variabilidad.

Lammoglia MA (2010).

5. TÉCNICAS DE COLECCIÓN DE EMBRIONES

Técnica No Quirúrgica

En 1976 fueron publicadas tres técnicas no quirúrgicas de recuperación de embriones al mismo tiempo. Desde entonces estas técnicas han sufrido modificaciones, pero la base sigue siendo la misma: Introducción de una sonda a través de la vagina hasta su ubicación en el útero y la introducción de un medio de lavado apropiado para el útero y su recuperación posterior. Debe tenerse presente que estas técnicas no quirúrgicas pueden ser usadas cuando los embriones se encuentran en el útero, generalmente los días 6-8 después del estro (el primer día del estro se designa como día 0).

Actualmente existe básicamente una técnica no quirúrgica de colección de embriones con dos modalidades o métodos diferentes:

- 1) Recuperación por gravedad con circuito cerrado y circulación.
- 2) Recuperación por aspiración interrumpida (método de la jeringa).

Dentro de estas modalidades se describen infinidad de variables, combinaciones, adaptaciones, etc. Cada técnico o grupo de trabajo tiene su propio método. Lo importante en la colección es el éxito que se obtenga al aplicarla y esto se traduce en la obtención de un alto porcentaje de embriones, con referencia al número de ovulaciones. El técnico que la realiza debe sentirse seguro y cómodo, y la técnica empleada no debe causar daño a la donante.

Se coloca la donante en un potro o sujeción y las heces son evacuadas del recto. El número de cuerpos lúteos (CL) es estimado en este momento o bien después de realizar la anestesia epidural (xilocaína al 2%). Es importante no comenzar el trabajo de colección de embriones sin tener la seguridad de que la anestesia haya tenido efecto. Se lava la región perineal y labios vulvares con agua y jabón desinfectante y se seca el área. La cola se amarra a un costado de la donante. En

aquellos casos en los cuales, a pesar de la anestesia epidural, persiste tonicidad en el recto, es recomendable usar xilocaína directamente en la mucosa rectal.

Existen básicamente tres clases de catéteres para la colección no quirúrgica: Foley de dos vías, Foley de tres vías, y el modelo Neustadt/Aisch (Rush). Todos los catéteres tienen un globo en un extremo, que se puede hinchar y sirve para fijar la sonda al cuerno uterino y cerrar el extremo distal de este. También existen distintos grosores, para usarlos en vacas o novillas. Los catéteres más usados son los Foley de dos vías y las Rush. Los catéteres de Foley son fáciles de encontrar en el comercio y son relativamente baratos. Tienen algunos inconvenientes para usarlos en colección de embriones debido a que son relativamente blandos y cortos (sobre todo cuando se usan en vacas grandes). Miden 40 cm de largo, el extremo entre el globo y la punta mide 3 cm y presentan dos orificios; actualmente las casas especializadas ya ofrecen sondas Foley largas y otras desechables de silicona.

El modelo Neustadt/Aisch (Rush) tiene ventajas sobre los Foley; es más largo (67 cm) y lleva un fiador especialmente diseñado para el catéter, lo que permite introducirlo más profundamente dentro de los cuernos. El extremo entre el globo y la punta mide 5.5 cm y tiene cuatro orificios.

Además, trae incluido en el otro extremo una adaptación Luer/Lock. Al catéter se le introduce un estilete metálico, se le coloca un lubricante estéril soluble en agua y se introduce a través de vagina y cervix. Una vez pasado el cérvix el catéter es llevado directamente a uno de los cuernos, es recomendable seguir siempre la misma rutina, para evitar errores, por lo que empezaremos siempre por el mismo cuerno, y una vez lavado pasaremos al otro. Una vez colocado en el cuerno, el estilete es retirado 2 ó 3 cm y el catéter es empujado suavemente. Esta maniobra

se repite hasta que la punta del catéter esté en la posición deseada (mitad del cuerno o ligeramente más craneal).

El balón es inflado inicialmente con 5 ml de suero salino o aire, palpado y nuevamente inflado hasta que se sienta sujeto en el lumen uterino. Para esta maniobra es recomendable tensar el catéter para observar si hay deslizamiento. Si el balón es inflado rápidamente o sobreinflado puede romper el endometrio y causar hemorragia. El estilete es entonces removido totalmente y se coloca una pinza en el extremo posterior de la vía del balón del catéter, para evitar que este se desinfle.

Hasta este momento las maniobras son iguales para las modalidades de recuperación por gravedad y por aspiración.

Recuperación de embriones

Actualmente los embriones se recogen en filtros especiales tipo En-com existiendo diferentes marcas en el mercado; estos filtros permiten el paso de líquido pero no de embriones. Antiguamente se usaban frascos de plástico o cristal siliconizado.

El PBS se puede comprar y su presentación es en bolsas de uno o dos litros, o puede ser fabricado por uno mismo e introducido en bolsas para su posterior utilización, aunque también puede ser almacenado en botellas, pero es menos práctico.

La unión entre la bolsa que contiene el PBS y la sonda se realiza por medio de una tubería en forma de -Y-, un extremo está conectado a la bolsa, otro a la sonda y el otro al filtro tipo En-com. Muchos equipos interponen, en el extremo que va de la bolsa de PBS a la sonda, una válvula antireflujo que permite el paso del PBS en un solo sentido, siempre conectada la válvula a una jeringa; este sistema facilita

mucho el lavado y permite la recolección sin necesidad de estar permanentemente masajeando el cuerno uterino.

1) Recuperación por gravedad con circuito cerrado: La sonda se coloca en el cuerno uterino que vamos a lavar, pudiendo colocarse muy profunda, o poco profunda; la cantidad de PBS que se ha de introducir cada vez es diferente según la colocación que hemos realizado. Cuando no se usan válvulas anti-reflujo hay que tener permanentemente la mano introducida en el recto para saber cuándo se ha llenado el cuerno uterino e interrumpir la entrada de PBS, se masajea ligeramente el cuerno y se procede a su extracción por gravedad. Si se usan estas válvulas y una colocación profunda de la sonda, se calcula la cantidad de PBS que cabe en el extremo distal del cuerno y se va introduciendo con una jeringa, recuperándolo por gravedad, no siendo necesario permanecer con la mano en el recto.

2) Recuperación por aspiración interrumpida: Algunos equipos introducen el PBS conectando directamente la sonda a una jeringa y aspirando con la misma jeringa, el PBS introducido, para una vez extraído, pasarlo a un filtro, depositarlo en frascos o directamente en placas de Petri.

Ávila GJ, Bailon BA. (2009).

6. MEDIOS DE COLECCIÓN Y MANTENIMIENTO

Un medio de cultivo de embriones ideal será aquel que se asemeje químicamente al medio en que se encontraban los embriones al momento de ser colectados. Los embriones mamíferos están altamente adaptados al medio uterino de la madre por lo que se hace imprescindible mantenerlos en condiciones óptimas. El pH

debería mantenerse a 7.3 0.4, la osmolaridad (concentración de sales) en 285-300 miliosmoles/Kg.

Existe una gran variedad de medios de cultivo pero el más popular actualmente es el Dulbecco's Buffer Salino (PBS). Debido a que tiene fosfato (Cuadro 9) como tampón su pH cambia en forma mínima al ser expuesto a la atmósfera, por lo que lo hace también un medio ideal para las condiciones de granja. Otros medios son el TCM-199, HMS F-10, MEM, etc., todos tienen el inconveniente que su pH cambia fácilmente al ser expuestos a la atmósfera, ya que su tampón es el bicarbonato, por lo que deben mantenerse equilibrados con 5 0.5% CO₂ y 95% de aire.

El medio que se utiliza para la colección de embriones es diferente en cuanto a los aditivos usados y las concentraciones de los mismos, frente al medio de mantenimiento.

Cuadro 9. Composición del medio Dulbecco's Fosfato Buffer Salino (PBS) para colección y mantenimiento de embriones

Compuesto	Colecta g/l	Mantenimiento g/l
NaCa	8.00	8.00
KCl	0.20	0.20
CaCl	0.10	0.10
MgCl	0.10	0.10
NaHPO (2H ₂ O)	1.15	1.15
KHPO	0.20	0.20
ADITIVOS		
Penicilina	100 UI	100 UI
Estreptomycin	100 µg	100 µg

Jesús Arriaga Valladares

Fungizona	25 µg	25 µg
Suero fetal*	1-2%	1-2%
Piruvato	0.33 mM	0.33 mM
Glucosa	1 mg	1 mg

* Otros sueros pueden ser: Suero de ternero recién nacido (NCS), albúmina sérica bovina (BSA) o suero de novillo (steer serum o donor serum). Todos deben ser inactivados por calor y estar libres de toxinas y agentes patógenos.

Para preparar 1 litro de medio:

1. Se debe usar agua bidestilada en un matraz
2. Agregue los componentes previamente mezclados (polvo) en un matraz con el agua bidestilada (menos el CaCl) a 15-30 C (temperatura ambiente) y agitar constantemente.
3. Una vez que se alcanza la dilución de los productos químicos agregue el cloruro de calcio (0.10 gr) y aforar a 1 litro.
4. Esterilizar y filtrar usando un filtro de 0.22 µ.
5. El medio de colección (sin aditivos) se puede guardar en el refrigerador.
6. Los aditivos (suero fetal, antibiótico) deben agregarse en el momento de la colección. Estos aditivos pueden dosificarse y congelarse, de modo que cuando van a ser utilizados solo se descongela lo necesario.
7. Algunos autores no encuentran necesario el agregado de piruvato y glucosa en el medio.
8. Se ha comprobado que el antioxidante de la goma del embolo de las jeringas plásticas, es tóxico para los embriones. Se recomienda la utilización de jeringas con émbolo de plástico para el medio de mantenimiento. En el caso de las jeringas de colección, el antioxidante se diluirá en la gran cantidad de medio y no afectara a los embriones. De todas maneras se pueden enjuagar las jeringas con un poco de medio previo a la colección.

Los medios sin aditivos pueden adquirirse en forma líquida o liofilizada. Es importante la calidad de agua que se utiliza ya que puede afectar seriamente los resultados.

También es importante controlar periódicamente la osmolaridad y el pH de los medios a utilizar. En caso de no tener la posibilidad de conseguir agua bi o tridestilada sin ningún tipo de toxinas, es aconsejable comprar el medio líquido ya preparado que si bien es más caro ahorra problemas y mejora los resultados.

De la Fuente JA., Monge A., Cocero M.J., Barragan C. (1992)

7. BÚSQUEDA Y MANIPULACIÓN DE LOS EMBRIONES

No hay duda que la localización, identificación, manipulación, clasificación, y evaluación de los embriones son las tareas más difíciles que debe enfrentar aquel que está aprendiendo la técnica del trasplante de embriones.

Los embriones se buscarán a 10X o 15X aumentos.

El medio de colección se deja sedimentar en una probeta de 500 ml por 20-30 minutos, después de finalizada la colección. El sobrenadante se extrae por aspiración hasta que el medio baje hasta la marca de 50 ml. Lo que queda en la probeta se coloca dentro de placas de Petri estériles y descartables (100 x 15mm) y se busca con un aumento de 10X. Se pasa el sobrenadante (450 ml) por un filtro de plancton de 50 μ m como paso final para recuperar cualquier óvulo o embrión que haya quedado.

Actualmente también se puede filtrar directamente todo el medio de colección utilizando filtros descartables estériles (Vet Concepts Spring Valley, USA). Finalizado

el filtrado se lava el filtro con PBS utilizando una jeringa y aguja fina (22 G) y el fluido de lavado es colectado en una placa de Petri estéril para proceder a la búsqueda de los embriones.

Para mayor seguridad cada placa se repasa por dos veces más, después de encontrado el último embrión. Finalizada cada búsqueda se realiza un movimiento rotativo con la placa para despegar algún posible embrión adherido a los bordes. A medida que se van encontrando los embriones se los va colocando en una placa de Petri pequeña que contiene el medio de mantenimiento (PBS + 10-20% FCS).

Para cambiar a los embriones de placa se utiliza una micropipeta conectada a una jeringa de 1 ml (de tuberculina) o un catéter estéril.

Cuando la búsqueda se ha completado los embriones son evaluados y colocados en medio de mantenimiento fresco. Posteriormente son lavados al menos tres veces, siendo preferible realizarlo 10 veces en medio estéril.

Antes de ser transferidos los embriones son nuevamente colocados en un medio fresco.

Si los embriones se van a conservar por más de 6h deberán ser colocados en medios de cultivo fresco dentro de un tubo de ensayo y almacenados en un termo o en un vaso con agua en el frigorífico.

Valencia MJJ (2009).

8. IDENTIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES

El diámetro de un ovocito es de aproximadamente 140-170, incluyendo el grosor de la zona pelúcida. El diámetro del ovocito permanece prácticamente sin variación desde el estado de 1 célula hasta el estado de blastocito expandido.

El número de células de un embrión puede ser contado sin dificultad hasta el estado de 16 células. Hasta este estado los embriones se dividen geométricamente, después las células se dividen asincrónicamente y la individualización se hace dificultosa. Cuando el embrión alcanza el estado de 32 células se produce la compactación, en la cual los blastómeros pierden su forma esférica y comienzan a adherirse entre ellos. En este estado el embrión recibe el nombre de MÓRULA.

Posteriormente, en el estadio de BLASTOCISTO, los blastómeros comienzan a diferenciarse dando origen a dos tipos de células, las células del trofoblasto y el macizo celular interno (MCI). Las primeras darán origen a la placenta y el MCI dará origen al feto. Es más fácil distinguir el MCI cuando el embrión se encuentra en el estado de BLASTOCISTO EXPANDIDO que en estadios anteriores.

La zona pelúcida refleja la luz del microscopio observándose como una estructura transparente. El color de los blastómeros es más oscuro que el debrís celular, lo que ayuda a la búsqueda del embrión. Es una buena práctica mover el debrís celular y mucus que se encuentra en la placa, ya que los embriones tienden a adosarse a ella.

La individualización de embriones de 8-10 días de edad es difícil ya que rompen la zona pelúcida, escapando de ella y el embrión puede ser confundido con grupos de células desprendidas del endometrio al momento del lavado.

Estadios de desarrollo del embrión

Se identifican de acuerdo al desarrollo morfológico. Por ejemplo de 8 células, 16 células, por lo que reciben diferentes nombres:

a) MÓRULA: Se asemeja a una mora. Los blastómeros son difíciles de discernir uno de otro. La masa de células (embrión) ocupa casi todo el espacio intrazonal (edad estimada de 5-6 días).

b) MÓRULA COMPACTA: Los blastómeros se han juntado formando una masa compacta. El embrión ocupa el 60-70% del espacio intrazonal (edad estimada de 6 días).

c) BLASTOCISTO TEMPRANO: Presenta una cavidad con fluido o blastocelo, dando la apariencia de un sello como anillo. El embrión ocupa 70-80% del espacio intrazonal. Se puede, en este estadio, comenzar a diferenciar en forma visual el trofoblasto y el macizo celular interno (edad estimada 7 días).

d) BLASTOCISTO: Presenta una diferencia clara entre el trofoblasto externo y el macizo celular interno (más oscuro). El blastocisto es identificado con claridad y el embrión ocupa casi todo el espacio intrazonal (edad estimada 7-8 días).

e) BLASTOCISTO EXPANDIDO: El diámetro aumenta 1.2 a 1.5 veces. La zona pelúcida se adelgaza aproximadamente 1/3 del grosor original. Los embriones en este estadio se pueden encontrar colapsados (edad estimada 8-9 días).

f) BLASTOCISTO ECLOSIONADO: En este estadio los embriones pueden estar en el proceso o estar completamente fuera de la zona pelúcida. Los blastocistos

eclosionados son esféricos con el blastocele bien formado o colapsado. Es muy difícil en este estado la identificación del embrión por un operador inexperto (9-10 días).

9. CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES

Con la clasificación se pretende evaluar la calidad del embrión. Se clasifican en base a sus características morfológicas que lógicamente es subjetiva y dependerá muchas veces de la experiencia del operador. No hay duda que la viabilidad de los embriones solo se puede predecir evaluando la tasa de preñez obtenida después de ser transferidos.

Algunas de las características que se analizan para clasificar a los embriones se describen a continuación:

1. Forma del embrión.
2. Color y textura de la masa celular.
3. Número y compactación de los blastómeros.
4. Diferencia de tamaño entre blastómeros.
5. Tamaño del espacio perivitelino.
6. Presencia de blastómeros sueltos, degenerados o detritus celulares.
7. Presencia, número y tamaño de vesículas (indican degeneración).
8. Apariencia de la zona pelúcida (fracturas, etc.).

De acuerdo con estas pautas los embriones se clasifican en:

1) EXCELENTE: El embrión ideal. Esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniformes.

2) BUENO: Pequeñas imperfecciones como algunos blastómeros sueltos, tamaño irregular o algunas vesículas.

3) REGULAR: Problemas mas definidos, incluyendo presencia de blastómeros sueltos, vesiculaciones o algunas células degeneradas.

4) MALO: Problemas severos. Numerosos blastómeros sueltos, células degeneradas, células de distinto tamaño, numerosas vesículas.

5) DEGENERADO: Blastómeros desorganizados y sueltos. Células de apariencia vesicular, granular o crecimiento retardado en relación con el resto de los embriones obtenidos.

6) INFERTILIZADO: Pueden ser confundidos con una mórula. Apariencia granular, rodeado por una membrana vitelina lisa o en caso de estar rota esta, el punteado cubrirá completamente el espacio vitelino.

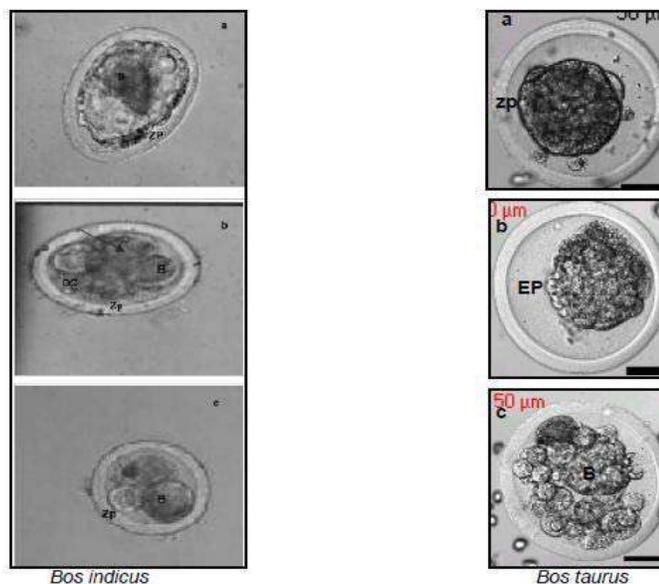


Figura 1. Embriones bovinos a) buenos, b) regulares y c) malos. ZP=Zona Pelúcida, DC= Detritus celulares; B= Blastómeros; Flecha indica la presencia de vesículas; EP= espacio perivitelino.

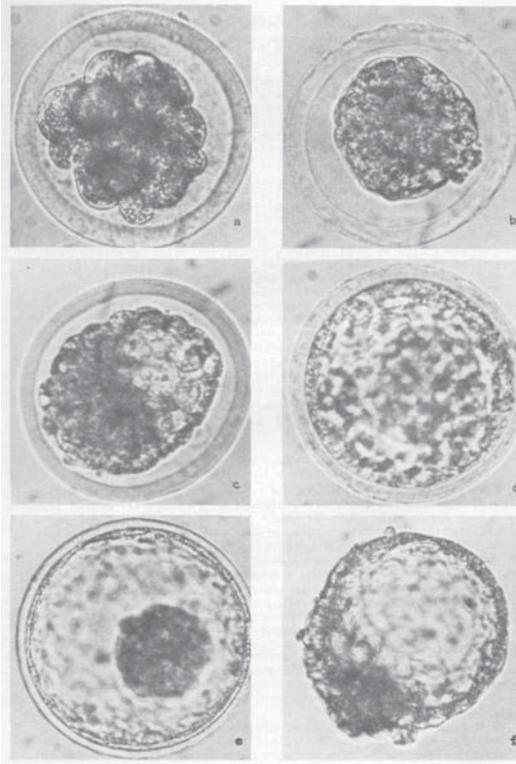


Figura 2. Mórula temprana (a); mórula compacta (b); blastocito temprano (c); Blastocito (c); blastocisto expandido (e) y blastocito eclosionado (f).

CUADRO 10. Guía propuesta por la Asociación Internacional de Trasplante de Embriones (IETS).

Estado de desarrollo		Calidad morfológica	
Número	Etapa	Número	Calidad
1	Infertilizado	1	Excelentes o buenos
2	2 a 12 células	2	Regulares
3	Mórula temprana	3	Malos

Jesús Arriaga Valladares

4	Mórula	4	Muertos o Degenerados
5	Blastocisto temprano		
6	Blastocisto		
7	Blastocisto expandido		
8	Blastocisto eclosionado		
9	Blastocisto eclosionado elongado		

Los embriones de calidad 1 son los mejores para congelar, los de calidad 2 pueden ser congelados con pobres resultados, pero aceptables para ser transferidos frescos. Los de calidad 3 tienen índices de preñez regulares y son raramente transferibles.

Valencia MJJ (2009).

10. CONGELACIÓN DE EMBRIONES

La congelación de embriones tiene muchas aplicaciones en programas de trasplante embrionario, tales como la facilidad del manejo de las receptoras, reduciendo los costes. La época de partos puede ser programada, aún cuando la colección de las donantes y la congelación se realicen durante todo el año. Además, permite la importación y exportación de embriones y el testaje de enfermedades contagiosas mientras los embriones se tienen en cuarentena.

Otras ventajas son:

- 1) Las receptoras no tienen que ser sincronizadas para el día de la colección.

- 2) El parto puede ser programado para el período más adecuado, en el ganado de carne para el período de mejor y mayor cantidad de alimento.

- 3) Los embriones congelados pueden ser transportados a larga distancia más fácilmente, a menor coste y con menor riesgo de transmisión de enfermedades que los animales vivos.

- 4) Cuando se colecta una mayor cantidad de embriones de buena calidad que las receptoras disponibles los embriones excedentes pueden ser congelados para ser transferidos posteriormente.

- 5) Se puede crear un banco de embriones con caracteres genéticos deseados para ser utilizados en tiempo y lugar elegidos.

Principios básicos

La congelación de una célula viviente constituye un proceso físico-químico complejo de intercambio de calor y transporte de agua entre la célula y el medio que la rodea. Existe una velocidad de enfriamiento óptimo para cada tipo celular, dependiendo del tamaño de la célula, su relación de superficie/volumen, su permeabilidad al agua y el coeficiente de temperatura de esa permeabilidad.

En el caso de la congelación de embriones, el objetivo principal es la viabilidad del embrión en las etapas de congelación y descongelación. Para ello debe respetarse la tasa de enfriamiento, y evitar la formación de cristales que puedan llegar a destruir las células.

Normalmente, el medio que contiene los embriones se enfría por debajo del punto de congelación sin la formación de cristales, este fenómeno se llama superenfriamiento, y posteriormente (a una temperatura más baja) se forma el núcleo de congelación, seguido por la liberación del calor latente de fusión que produce un aumento de temperatura hasta la temperatura de cambio de estado. Para evitar este inconveniente la formación del núcleo de congelación es inducido en el medio extracelular, alrededor de 2°C por debajo del punto de congelación del medio, proceso conocido como "seeding" o siembra.

En la congelación controlada de embriones el embrión va sufriendo un proceso de deshidratación paulatina. El agua dentro del embrión y entre los cristales de hielo, no se congela a esta temperatura porque los solutos en el agua descienden el punto de congelación.

En un mayor descenso de temperatura los cristales de hielo se agrandan, la concentración de solutos aumenta y los embriones responden osmóticamente perdiendo agua al medio extracelular aún no congelado.

Los embriones pueden ser dañados durante la congelación y descongelación, principalmente debido a los efectos de solución o a la formación de cristales intracelulares.

Para evitarlo el daño, los embriones se deben congelar los embriones a temperaturas menores de 1°C/min. Esto es, no tan rápido como para impedir la salida de agua con la consecuente formación de cristales intracelulares, ni tan lento como para que la excesiva concentración de sales afecte a los embriones.

Los embriones normalmente se almacenan en nitrógeno líquido a -196°C. Las únicas

reacciones que ocurren a esa temperatura son ionizaciones directas debidas a radiaciones de fondo. Consecuentemente, en un tiempo de almacenamiento de 200 años es improbable que afecte la supervivencia de los embriones congelados.

Crioprotectores

La función de los crioprotectores es la de proteger a las células de lesiones producidas por la congelación. Existen muchos tipos de crioprotectores, que se agrupan según la posibilidad de penetración o no de las membranas celulares. Así los crioprotectores permeables más utilizados: Glicerol, Dimetil sulfoxido (DMSO), Etilenglicol, 1,2 Propanediol.

Los crioprotectores no permeables (que no atraviesan la membrana) más utilizados son: Sacarosa, Dextranos, Polivinil pirrolidona (PVP).

Se cree que los crioprotectores actúan reduciendo la cantidad de hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación, moderando así los cambios en concentración de solutos. Un buen crioprotector debe tener alta solubilidad, baja toxicidad a altas concentraciones y un bajo peso molecular para lograr una mayor permeabilidad y para obtener el máximo efecto coligativo. Hace unos años, el glicerol era el crioprotector más utilizado en la congelación de embriones bovinos, actualmente el etilenglicol es el más usado ya que permite la transferencia directa, con un importante ahorro de costos.

Cuando el embrión se expone a los crioprotectores inicialmente se contrae por la pérdida de agua a causa de la hiperosmolaridad de la solución extracelular y porque el embrión es mas permeable al agua que al crioprotector. La contracción va a continuar hasta que el reflujó del agua es equilibrado por el

influjo de crioprotector. El crioprotector entrará al embrión a una velocidad que dependerá del coeficiente de permeabilidad y la temperatura. Posteriormente el agua se re-introducirá a la célula, siendo el equilibrio completo cuando el volumen de agua de los embriones alcanza su volumen isotónico original.

La respuesta opuesta ocurre cuando el crioprotector se extrae de la célula. Cuando la concentración del crioprotector disminuye inicialmente, el agua entrará al embrión y si la dilación no se lleva a cabo con cuidado, las células pueden dilatarse hasta un tamaño perjudicial.

Después de la descongelación deberemos extraer el crioprotector del embrión. El método empírico es el de diluir paso a paso con PBS pipeteando los embriones por soluciones de concentración decreciente, por ejemplo en pasos de -0.25M. En realidad este procedimiento ha caído en desuso debido a su complejidad.

Actualmente se utilizan solutos no permeables como la sacarosa, en el medio de dilución que debe tener un volumen 10 veces mayor que el volumen de medio que contiene al embrión. La sacarosa actúa como fuerza osmótica para restringir el movimiento del agua a través de la membrana. La contracción y la expansión de los embriones observada durante el tratamiento con sacarosa es una indicación de la integridad de la membrana, y que esta no fue afectada por la congelación. Existen dos procedimientos diferentes para la retirada del glicerol, uno es introduciendo los embriones directamente en una solución compuesta por PBS + 0,4% BSA y Sacarosa 1M después de 7 minutos se lavan en PBS + 0,4% BSA y quedan listos para la transferencia. El otro procedimiento consiste en utilizar soluciones decrecientes de glicerol en PBS + 0,4% BSA, así pasaremos del 10% de glicerol (medio de congelación) al 6% de glicerol y sacarosa 0,3M, 3% de glicerol y sacarosa 0,3M y 0% de glicerol y sacarosa 0,3M y finalmente en el medio de transferencia; los embriones se mantienen 5 minutos en cada etapa.

Recientemente, se han desarrollado métodos prácticos y rápidos para extraer el glicerol de los embriones descongelados. Un ejemplo es el método conocido como "One step Straw" que contienen glicerol y sacarosa separados por una burbuja de aire. Después de la descongelación la pajuela se agita, permitiendo la mezcla de soluciones y posteriormente se procede directamente a transferir el embrión. En nuestra experiencia este método es válido pero el cargado de la pajuela es muy difícil debido a que se debe mantener una la relación 10/1 en el medio con sacarosa comparado con el medio con glicerol.

El uso del Etilenglicol 1.5M como crioprotector, proporciona una importante ventaja

frente al glicerol, dado que no es necesario el uso de sacarosa para extraer al crioprotector y los embriones pueden ser transferidos directamente, ya que los embriones volverán a su estado original al contacto con el medio intrauterino.

Protocolo tradicional de congelación y descongelación de embriones

- 1) Seleccionar los embriones de buena y excelente calidad (calidad 1 según la IETS).
- 2) Introducir los embriones en:
 - a) Una solución de glicerol 1.5M por 10 minutos a temperatura ambiente (20°C).
 - b) Soluciones de glicerol (2 pasos): 0.75M por 5-10 minutos y 1.5M por 6-10 minutos.

c) Una solución del 10% de etilenglicol a temperatura ambiente (20°C)

- 3) Colocar los embriones con la solución crioprotectora en pajuelas de 0.25 ml. Utilizando la técnica descrita para transferencia (medio-aire-medio con embrión-aire-medio). Luego se sellan las pajuelas.
- 4) Colocar las pajuelas en el congelador que ya está preparado a -6.5°C y se deja equilibrar por 8-10 minutos.
- 5) Inducción de cristales "SEEDING", tocando las pajuelas con un fórceps previamente enfriado en nitrógeno líquido. El "seeding" se realiza en el extremo superior de la columna de medio que contiene al embrión (lo más alejado posible del embrión).
- 6) Mantener a -6.5°C por 8-10 minutos.
- 7) Congelar a una velocidad de 0.3 a 0.5°C por minutos hasta llegar a -35°C.
- 8) Almacenar en N₂ líquido.
- 9) Descongelación: La pajuela conteniendo al embrión se debe extraer del nitrógeno líquido lo más rápidamente posible y proceder a su descongelación, con alguna de las técnicas siguientes:
 - a) agua tibia (20 a 35°C).
 - b) Aire a temperatura ambiente (22°C)
 - c) Aire 10-15 segundos y agua a 25-30°C Es el procedimiento más habitual y el que mejores resultados proporciona.

10) Colocar el embrión en la solución de descongelación:

a) Soluciones decrecientes de glicerol (0.25M) por 8-10 minutos (c/u).

b) Sacarosa 0.5M-1M por 8-10 minutos.

c) Método de 3 pasos de 5 minutos (c/u):

En 0.6% glicerol + 0.3M sacarosa.

En 3% glicerol + 0.3M sacarosa

En 0.3M sacarosa.

10.1) En caso de utilizar ETG como crioprotector se realiza la TE directamente en la receptora.

11) Evaluar los embriones, colocarlos en PBS estéril, y transferirlos inmediatamente Valencia MJJ (2009).

11. SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS

Los resultados en la transferencia de embriones son parcialmente dependientes de que el estro de las receptoras no difiera en más de 24 h con respecto al estadio del embrión que vamos a transferir. Las receptoras pueden ser obtenidas por un programa de detección de celos naturales o por programas de sincronización. En el primer caso debemos contar con un gran número de receptoras mientras que en el segundo el número se reduce sensiblemente. Esta decisión es difícil ya que en la actualidad existen más de 50 maneras diferentes de sincronizar calores.

Los índices de preñez no difieren en receptoras sincronizadas o con celo natural, no obstante, el factor más importante a tener en cuenta es una muy buena detección de celos, así como también un cuidadoso método de anotación.

La fase luteal es la parte del ciclo estral mas fácil de controlar por medio de agentes

externos. Se han desarrollado dos técnicas básicas:

1) Prolongar la fase progestacional, por medio de progesterona y compuestos progestágenos. Originalmente se comprobó que las inyecciones de progesterona prolongaban el ciclo durante el tiempo en el que eran administradas. Después de concluido el tratamiento las vacas entraban en celo con una razonable sincronía. Actualmente se ha popularizado el uso de diferentes dispositivos (CRESTAR, PRID, CIDR-B O EAZI BRED), que van a liberar el progestágeno en forma paulatina, reemplazando de esta manera a las inyecciones diarias.

2) Inducir la luteolisis por medio de prostaglandinas. Cuando las prostaglandinas son inyectadas en una vaca con cuerpo lúteo activo los niveles de progesterona descenderán a valores por debajo de 1 ng/ml en 24 h. Normalmente los síntomas de celo se muestran a las 60 a 72 h, mientras que la ovulación ocurre a las 90-96 h posteriores a la inyección de prostaglandina. El cuerpo lúteo será receptivo a la PGF_{2α} entre los días 7 y 18 del ciclo. Ninguna vaca responderá hasta el día 5 del ciclo, 25% en el día 6 y 66% en el 7. La respuesta es óptima en el día 8 a 17 pero nunca supera el 96%. Por lo tanto, el 50 a 70% de un grupo de animales que se encuentra ciclando, responderá a una sola inyección. Una segunda inyección 11 días después resultara en el estro de la mayoría de los animales, ya que las vacas se encontrarán entre los días 6 y 15 del ciclo. Debido a diferencias en la respuesta es improbable que más del 90% de las receptoras se sincronicen con la donante.

Existe cierta discrepancia en cuanto a los índices de preñez obtenidos cuando se compararon los tratamientos con prostaglandinas o con progestágenos sobre las

receptoras. En un reporte reciente los índices de preñez en 2092 receptoras sincronizadas con SMB no fueron diferentes de 1380 que expresaron celo natural.

Existen otros protocolos, que dependen de la condición del la propia explotación

1) En ganado en sistemas intensivos, consiste en aplicar GnRH y 7 días después PGf2 (Pursley et al., 1995). Los calores se manifiestan generalmente entre 24 y 72 horas después de la aplicación de PGF2 aunque la mayoría de ellos se concentran entre 24 – 36 h. Estos calores son bastante fértiles el único inconveniente es la manifestación de calores en un periodo de 72 h. También solo se esperan entre el 65% al 75% de manifestación de calores. Este protocolo puede auxiliarse un poco aplicando GnRH al momento del calor de las receptoras. Es recomendable el apoyo en la detección de calores utilizando el método de crayones en la base de la cola o la aplicación de parches detectores de calores.

2) En ganado del trópico principalmente con cierta cruce de Cebú y que no están en las mejores condiciones corporales pero si existe una buena detección de calores, es posible sincronizar el ciclo estral aplicando en el día 0 estradiol 17β (2.5 mg) y se coloca un dispositivo de progesterona intravaginal (Bo et al., 1995; Mapletoft et al., 2000). También se puede poner el implante de Norgestomet (Crestar; Intervet SA) y que trae su inyección de progesterona con estrógeno. Los implantes o dispositivos se retiran a los 7 días y se aplica 300 UI de eCG en animales jóvenes y 400 UI eCG en adultos mas prostaglandina $F_{2\alpha}$. En este momento es recomendable colocar parches o pintar la base de la cola para ayudar a detectar calores. Cualquier parche funciona bien. Se recomienda detectar calores por 3 días. Este protocolo da muy buenos resultados; sin embargo, la manifestación de calores puede ser del 75-85% dependiendo de la condición corporal de las receptoras.

3) Receptoras se encuentran en buenas condiciones corporales y reproductivas y la detección de calores fuera poco satisfactoria. El día 0 se inicia igual que el protocolo anterior con una inyección de estradiol 17 β (2.5 mg) y se pone un dispositivo intravaginal o un implante en la oreja (Bo et al., 1995). Siete días después se retiran los implantes y se aplican 300 UI de eCG en animales jóvenes y 400 UI de eCG en adultos (Murphy, 1991) mas PGF_{2 α} . A las 24 h de retirado los implantes recomiendo poner 2.5 mg de estradiol 17 β . Al igual que los otros protocolos es de utilidad colocar parches o pintar la base de la cola para ayudar a detectar calores. Se recomienda detectar calores por 3 días. La manifestación de calores en este protocolo es sumamente eficiente ya que cerca del 100% de las receptoras entran en calor 24 h posteriores a la aplicación de estradiol 17 β .

La desventaja de este protocolo es que se pueden presentar calores falsos y las receptoras no formaran CLs. Otra desventaja es que las receptoras pueden manifestar calores nuevamente 48 a 72 horas después del calor inicial y no se sabe cual calor fue el verdadero. De tal manera que si una receptora efectivamente repitió calor seria una receptora día 5 o incluso 4 el día de la transferencia de embriones lo que perjudicaría la fertilidad enormemente y peor aún, si los embriones transferidos fueran embriones congelados. Para reducir la manifestación de calores 2-3 días después del calor inducido se recomienda la aplicación de GnRH al momento del calor de las receptoras. La fertilidad de este protocolo puede ser bastante buena siempre y cuando las receptoras estén en muy buenas condiciones corporales y reproductivas.

RESINCRONIZACION DE LAS RECEPTORAS

Este método es muy práctico y permite la utilización de las receptoras vacías dos veces en 30 días. Este método consiste en poner los CIDRs usados a las receptoras transferidas y no transferidas 7 días después de la transferencia de embriones (Bo

et al., 2005). El CIDR se retira 7 días después o sea el día 21-22 del ciclo estral de las receptoras. Este método no utiliza ninguna hormona solo se pone y quita el CIDR 7 días después. La mayoría de las receptoras vacías entran en calor entre 24 y 48 horas después de retirado el implante (Bo et al., 2005).

El día 30 del ciclo estral de las receptoras se procede a transferir las receptoras que repitieron calor. Generalmente se transfieren embriones congelados. Con el auxilio del ultrasonido se puede aprovechar para diagnosticar las gestaciones del resto de las receptoras y se sabrá el resultado de la transferencia de embriones aproximadamente 3 semanas después de haber transferido los embriones. Este método es sumamente práctico y permite la reutilización tanto de los CIDRs como de las receptoras en 30 días.

Lammoglia MA (2010).

Manejo de receptoras

Dos de los factores de manejo que determinan el éxito o fracaso de un programa de sincronización son la nutrición y el intervalo post-parto. Cuando las receptoras fueron clasificadas de acuerdo a su estado nutricional en el momento de la transferencia en una escala que va de 1 (flaca) a 5 (gorda), los índices de preñez fueron superiores en las receptoras clasificadas como 3 y 4. Esta clasificación es muy fácil de utilizar y puede ser de mucha utilidad para el posterior análisis de los resultados. Se basa específicamente en la palpación de las apófisis transversas de las vértebras lumbares y la prominencia de la columna vertebral.

Otros factores nutricionales en los que se debe tener especial cuidado son las deficiencias minerales como fósforo y cobre.

Si se utilizaran vacas con cría, estas deben tener al menos un intervalo post-parto de más de 60 días y un tracto reproductivo normal a la palpación o examinación ultrasonográfica. Además deben estar en un período de aumento de peso y si es posible, haber ciclado 3 veces antes de entrar al programa de sincronización. Si vamos a utilizar novillas estas deben tener un peso de mas de 300 Kg, tener un estado óptimo (condición corporal: 3.0 - 3.5) y ciclar normalmente (cada 18 a 21 días). En cualquier caso, el peso y la edad debe estar acorde a lo estándar en la raza.

No se deben descuidar los aspectos sanitarios del rebaño así como la disponibilidad del personal e instalaciones adecuadas. En lo posible el personal afectado en la detección de celos debe llevar y recopilar datos precisos y detallados. Las instalaciones deben ser funcionales y seguras tanto para el operador como para los animales, especialmente si las receptoras son de producción de carne de razas autóctonas. Además, es importante contar con un techo sobre la manga y en lo posible con una pequeña habitación que pueda permitir la instalación de microscopios y demás materiales necesarios a una corta distancia de la manga.

Todos estos factores deben ser tenidos en especial consideración para el éxito del programa. Es fundamental tener una debida comunicación con el personal. Es inclusive recomendable reunir a todos las personas afectadas al programa antes de comenzar con la sincronización.

Avila GJ, Bailon BA. (2009).

12. TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS

Existen dos técnicas para la implantación de los embriones en las hembras receptoras; según sean cruentas (quirúrgicas) o no cruentas (no-quirúrgicas). La técnica de elección es la forma no quirúrgica, sin embargo existe una gran diferencia en los resultados entre ellas, aunque estas diferencias se deben no tanto a la técnica en sí, sino a la experiencia y habilidad de cada persona.

Las técnicas quirúrgicas tienden a producir mejores resultados (mayor porcentaje de preñez), pero tienen el inconveniente de que se necesita mas personal entrenado y ciertas facilidades para realizarlas en la granja.

La **TRANSFERENCIA QUIRÚRGICA** puede ser realizada mediante laparotomía ventral o lateral:

Laparotomía Ventral

Esta técnica no se puede realizar en la práctica en la granja. Se ha de realizar en quirófano con anestesia general Tiene aplicación en investigación (fertilización *in vitro*, clonig, etc.).

Laparotomía Lateral

Esta técnica no es difícil de realizar y no requiere demasiado equipo de cirugía. Es necesario tener un potrero protegido de la lluvia y buenas instalaciones para mantener un grupo de animales. Un veterinario con ayudante y otras dos personas más pueden transferir 6 a 8 embriones por hora (en estudios canadienses se obtuvo un porcentaje de preñez del 65% utilizando esta técnica, en 1980).

La receptora es colocada en un potro que permite realizar la laparotomía lateral izquierda o derecha. Primero se procede a realizar un examen rectal para constatar la presencia del cuerpo lúteo. Los preparativos de asepsia de la operación son corte de pelo en el área, lavado y desinfección. Se procede a inyectar anestesia local (xilocaína al 2%) por infiltración, también se puede usar anestesia paravertebral (L: 1, 2, 3).

Se realiza la incisión paralela a la última costilla en el lado ipsilateral del ovario que posee el CL, de no más de 10 cm de longitud y lo mas posterior que sea posible (aproximadamente a una mano de distancia de las apófisis de las vértebras lumbares y a una mano del borde de la ultima costilla). Se incide la piel y las capas de tejido. El músculo oblicuo abdominal interno y el recto son separados con los dedos o con una pinza roma.

Se procede a identificar nuevamente el cuerpo lúteo (palpando los ovarios directamente en la cavidad abdominal). Muchas veces es posible identificar visualmente el ovario a través de la incisión. Se exterioriza el cuerno de ese lado traccionando el ligamento ancho a la altura del tercio distal del cuerno.

Para una mejor sujeción del cuerno se usan compresas de gasa entre los dedos pulgar e índice. El cuerno es punzado cerca de la unión útero-tubárica con una aguja roma o estilete (sonda de pezón) hasta alcanzar el lumen. El estilete es retirado, y el embrión es depositado en el lumen uterino utilizando un catéter intravenoso, presionando cuidadosamente el émbolo de la jeringa. El catéter es retirado lentamente y el útero es devuelto a la cavidad abdominal.

La herida operatoria puede ser suturada por capas (peritoneo, músculo, piel) o simplemente se sutura la piel (sutura simple) dejando las otras capas sin suturar.

Esta última forma es muy rápida y no tiene mayores complicaciones para el animal.

La utilización del Planipart administrado entre 30 minutos a 3 horas previamente a la transferencia, puede mejorar los índices de preñez.

MÉTODO NO QUIRÚRGICO

El método no quirúrgico de transferencia de embriones es usado con mucho éxito por la mayoría de los veterinarios. Casi todos utilizan pajuelas francesas de 0,25 ml, una vaina desechable plástica, y un inyector de Cassou para IA. También hay algunas modificaciones como por ejemplo pipetas metálicas, inyectores específicos para TE de metal o de plástico de un solo uso, para evitar infecciones, etc.

La receptora es colocada en un potro o sujeción y se procede a la palpación rectal para localizar el ovario que contiene al cuerpo lúteo. Esta oportunidad se aprovecha, en muchas ocasiones, para sacar las heces del recto lo que facilitará la manipulación del aparato reproductor y posteriormente la colocación del embrión.

Se realiza una anestesia epidural baja (xilocaína al 2%). La región perineal y vulva se lavan con jabón desinfectante, agua y se secan.

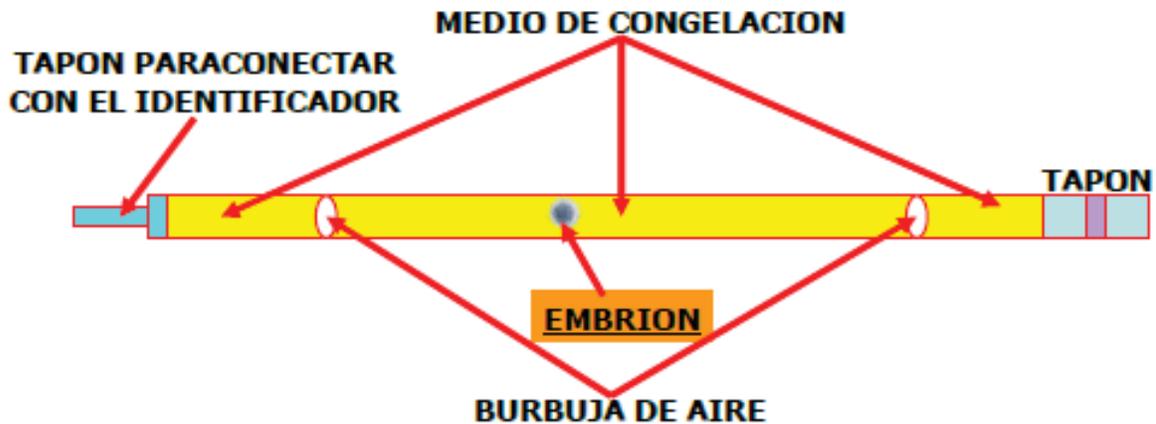
El embrión se coloca dentro de una pajuela esterilizada (0.25ml) de la siguiente forma:

- a. Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo
- b. Burbuja de aire

- c. Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo
- d. Burbuja de aire
- e. Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo con el embrión
- f. Burbuja de aire
- g. Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo

La primera columna de medio se hace tocar con el algodón y el alcohol polivinilo del extremo cerrado de la pajuela, esto sella un lado y no permite la salida del embrión antes de ser transferido. La pajuela con el embrión se coloca dentro del catéter de TE y este dentro de una vaina protectora o camisa sanitaria.

Figura 2. Esquema de llenado de la pajilla



Antes de introducir el catéter en la vagina se le coloca lubricante estéril que permitirá pasarla más fácilmente a través del cérvix.

Con la mano izquierda, el operador sujeta el cervix a través de la pared del recto. El catéter se introduce en el canal cervical y, posteriormente se introduce, con

ayuda de la mano, en el cuerno ipsilateral al CL. El embrión se deposita aproximadamente en la mitad del cuerno. El cateter es removido suavemente y se retira la mano del recto.

Todo ese procedimiento debe realizarse lo más rápido posible. Si hay mucha demora en la operación la posibilidad de preñez será menor, lo que podría deberse a daño en la mucosa del útero por exceso de manipulación. La excesiva manipulación del cérvix no parece ser tan negativa como la excesiva manipulación de los cuernos uterinos.

Para obtener un buen porcentaje de preñez, a parte de la destreza y experiencia en las técnicas descritas, es necesario que las receptoras sean animales sanos, que sus ciclos reproductivos hayan sido normales y que estén en buen estado de nutrición. En la medida en que las receptoras estén en buenas condiciones, la eficiencia de la transferencia de embriones, traducida en preñeces será mayor.

Desde un punto de vista práctico la transferencia de embriones es fácil y apasionante. Pero cada paso debe ser cuidadosamente realizado para que la técnica tenga éxito.

En nuestra experiencia el porcentaje de preñez obtenido por el método no quirúrgico varía del 35 al 65%, dependiendo de la calidad de los embriones transferidos y de la habilidad del operador para realizar todos los pasos de la técnica. Generalmente el porcentaje de preñez es de alrededor del 60% con embriones frescos y 40 a 50% con embriones congelados. Se puede anticipar una pérdida del 10% desde la detección de preñez y el destete de la cría.

Normalmente se dice que una vaca promedio produce por tratamiento superovulatorio 10 a 12 ovulaciones con 8 a 10 embriones recuperados, de los

cuales 5 a 6 son transferibles terminando finalmente con 3 ó 4 preñeces. Avila GJ, Bailon BA. (2009).

13 REFERENCIAS

Avila GJ, Bailon BA. (2009). Importancia de donadoras y receptoras- Memoria del Curso teorico-practico sobre Tranferencia de embriones en ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autonoma de México. Enero 29-31, 2009. México DF.

Avila GJ, Bailon BA. (2009). Técnica de colección y recuperación de embriones - Memorias del Curso teorico-practico sobre Tranferencia de embriones en ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autonoma de México. Enero 29-31, 2009. México DF.

Avila GJ, Bailon BA. (2009). Selección de receptoras y zincronización - Memoria del Curso teorico-practico sobre Tranferencia de embriones en ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autonoma de

Transferencia de embriones en ganado bovino. Revisión

México. Enero 29-31, 2009. México DF.

Avila GJ, Bailon BA. (2009). Tranferencia de embriones.- Memoria del Curso teorico-practico sobre Tranferencia de embriones en ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autonoma de México.
Enero 29-31, 2009. México DF.

Barros C.M, Bo G.A .(2005) Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle.

Theriogenology, v.65, p.77-88, 2005

Betteridge K.J. (1981). – An historical look at embryo transfer. J. Reprod. Fertil., 62 (1), 1-13.

Betteridge K.J. (2003). – A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. Anim. Reprod. Sci., 79 (3-4), 203-244.

Bo GA.(1995) . Exogenous control of follicular wave emergente in cattle, Theriogenology, 1995; 43:31-40

Bo, G.A.(2005). Application of fixed-time artificial insemination and embryo transfer programs in beef cattle operations. In: Proc Joint Mtg Am Embryo Trans Assoc & Can Embryo Trans Assoc Assoc, Minneapolis, MN. 2005, 10-19.

Broadbent PJ, Stewart M and Dolman DF.(1991.) Recipient management and embryo transfer. Theriogenology 35. 1: 125-139.

De la Fuente JA., Monge A., Cocero M.J., Barragan C. (1992) Transferencia de Embriones en Ganado Vacuno. *Bovinotecnia* n° 7. p: 145-159.

Fuentes S. (2000.) Utilización de tratamientos hormonales para la sincronización de receptoras de embriones. *Producción Animal* n° 160, pág. 26.

Lammoglia MA (2010). Nuevos protocolos de superovulación y sincronización de programas de transferencia de embriones en bovinos-Curso internacional de reproducción bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional autónoma de México. Mayo 19-21, 2010. México DF.

Mapletoft, RJ, Bo GA. (2000). Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. *Arquivos de la facultad de Veterinaria (UFRGS, Porto Alegre)* 2000, 28:23-48.

Mapletoft, R.J. (2002) Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. *Acta. Sci. Vet.*, v.33, p.209,2002.

Mapletoft RJ, Hasler J.F. (2005). Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2005, 24 (1), 393-403

Murphy, B.D.(1984) Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 1984; 21:117-125.

Murphy, R.J.(1991) Superovulation in the cow. Effects of biological activity of gonadotropins. *Proc 12th Ann. Conv. AETA*. 1991, Portland Maine.

Pursley, J.R.(1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using pgf2 and GnRH. *Theriogenology*, 1995; 44: 915-23.

Sa Filho MF, Martins CM, Sales SJN, Ferreira MR, Baruselli SP. (2010). Nuevos protocolos de superovulación en bovinos-Memorias del Curso Internacional de Reproducción Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México. Mayo 19-21, 2010. México,DF.

Sá Filho MF, Martins MC, Sales SJN, Ferreira MR, Baruselli SP (2010). AVANÇOS NOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO DE BOVINOS. Memorias del XII Curso Internacionald e Reproducción Bovina. FMVZ-UNAM. Mayo 19-22, 2010. Mexico DF.

Seidel G.E. Jr (1981). – Superovulation and in cattle. *Science*, 211 (4480), 351-358.

Thibier M. (2003). – More than half a million bovine embryos transferred in 2002: a report of the International Embryo Transfer Society Data Retrieval Committee. *IETS Newsletter*, 21 (4), 12-19.

Valencia MJJ (2009).Evaluación y manipulación embrionaria en bovinos.- Memoria del Curso teórico-práctico sobre Transferencia de embriones en ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México. Enero 29-31, 2009. México DF.

Valencia MJJ (2009).Criopreservación de embriones bovinos.- Memoria del Curso teórico-práctico sobre Transferencia de embriones en ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México. Enero 29-31, 2009. México DF.