

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“LA HORMONA FOLÍCULO ESTÍMULANTE (FSH) Y LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG) EN LOS TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS DE LOS PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN GANADO BOVINO”.

POR:

CARLOS ALBERTO TOLEDO MILLAN

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

AGOSTO DE 2003

001958

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

POR:

CARLOS ALBERTO TOLEDO MILLÁN

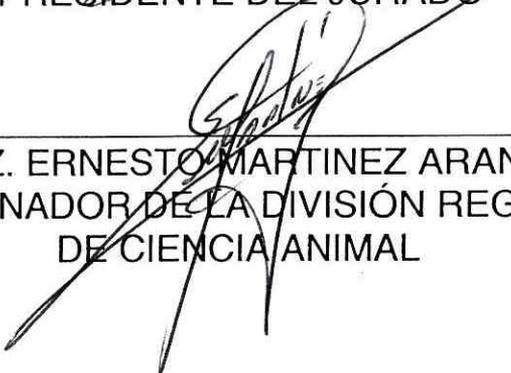
MONOGRAFÍA QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H.
JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR:



DR. CARLOS LEYVA ORASMA
PRESIDENTE DEL JURADO



M.V.Z. ERNESTO MARTINEZ ARANDA
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL

TORREÓN , COAHUILA

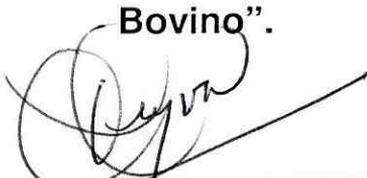
AGOSTO DE 2003

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“La Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Gonadotropina
Coriónica Equina (eCG) en los tratamientos Superovulatorios
de los Programas de Transferencia de Embriones en Ganado
Bovino”.**

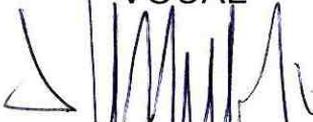


**DR. CARLOS LEYVA ORASMA
PRESIDENTE**



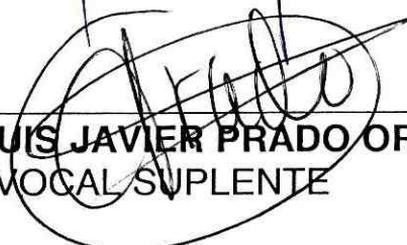
M.C. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE

VOCAL



M.C. SERGIO I. RIOS ZAPATA

VOCAL



M.V.Z. LUIS JAVIER PRADO ORTÍZ

VOCAL SUPLENTE

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

PRESIDENTE DEL JURADO



DR. CARLOS LEYVA ORASMA

VOCAL



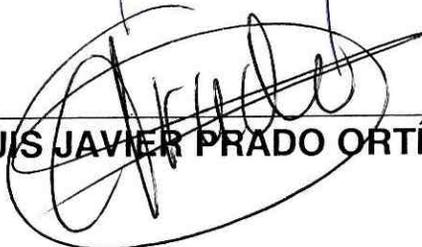
M.C. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE

VOCAL



M.C. SERGIO I. RÍOS ZAPATA

VOCAL SUPLENTE



M.V.Z. LUIS JAVIER PRADO ORTÍZ

DEDICATORIA

A mis padres por el apoyo que durante toda la vida me han brindado, y en especial en estos últimos años que me motivaron a seguir adelante, por los consejos y el cariño que me han dado.

A mis hermanos Francisco Javier y José David, por el cariño y la motivación que me dieron durante la carrera.

AGRADECIMIENTOS

A el, DR. Carlos Leyva Orasma por la excelente disposición en la realización de este trabajo, que gracias a su experiencia y apoyo pude realizar este trabajo.

A mis sinodales, MC. José de Jesús Quezada Aguirre, MC. Sergio I. Rios Zapata, M.V.Z. Luis Javier Prado Ortiz, por la gran disposición en la revisión de este escrito.

A mis compañeros, Francisco Bahena, Gilberto Pino, Carlos morales, Juan Luis Morales, Maricarmen Olague, Pedro Lagunas, Jorge Arroyo, Miguel y Rubén López, Balam Rodríguez, Yadira Mabel, Carlos carmona, Jose Luis Zaragoza, Samuel Aguirre, Manuel saens por los momentos que compartimos durante la carrera.

A todos mis primos y amigos de Tehuixtla Morelos.

TABLA DE CONTENIDO

I. Introducción.....	1
II. Revisión de literatura.....	5
2.1 Factores que afectan la respuesta superovulatoria.....	5
2.1.1 Momento del ciclo estral en que se inicia el tratamiento.....	6
2.1.2 Factores inherentes a la hembra.....	10
2.1.3 Factores ambientales.....	13
2.1.4 Presencia de un folículo dominante al momento de iniciar el tratamiento.....	15
2.1.5 Tipo de gonadotropina como factor en la respuesta superovulatoria.....	18
2.2 Gonadotropinas más utilizadas en superovulación.....	21
2.2.1 Esquemas de tratamientos superovulatorios con gonadotropinas.....	28
2.3 Situación actual de la transferencia de embriones en el ganado bovino.....	31
2.3.1 perspectivas de la transferencia de embriones según las nuevas biotecnologías.....	32
2.3.2 Estado actual del sexado del semen y su importancia en la transferencia de embriones.....	33
III. Conclusiones	36
IV. Literatura citada.....	37

1.- INTRODUCCIÓN.

Históricamente el ganado bovino ha representado la especie mas importante para el hombre como fuente de proteínas en su alimentación y como animal de trabajo. Uno de los factores de vital importancia para el desarrollo de la masa ganadera es indiscutiblemente la reproducción, la cual se debe tener en cuenta para una eficiente explotación pecuaria.

El funcionamiento reproductivo de la vaca juega un papel importante en la determinación del nivel productivo y la ganancia en las unidades de producción en todos los países lo que significa la necesidad del desarrollo de la ganadería moderna para incrementar la eficiencia productiva y reproductiva de esta rama. En la actualidad una de las tareas mas importantes que tienen la ciencia y la tecnología producto del incesante crecimiento de la población mundial es el abastecimiento de la sociedad humana con las proteínas de origen animal y para lograr esto, todos los esfuerzos deben estar dirigidos hacia la intensificación de la producción de carne y de leche a través del máximo aprovechamiento del potencial biológico productivo del animal Varizanga *et al.*, (1993).

Esta problemática es favorecida por los procesos de selección y mejora genética de la masa ganadera en la que la transferencia de embriones juega un papel relevante gracias a las ventajas que ofrece en cuanto a la obtención de descendencias numerosas y de gran valor genético. Como es sabido la transferencia de embriones tiene como objetivo central el aumento de la descendencia de hembras de alto valor genético.

En los últimos años, la transferencia de embriones se encuentra difundida por todo el mundo incluso a escala comercial y son muchos los países que desarrollan y aplican esta técnica por las amplias posibilidades que ella brinda, sin embargo, existen todavía varias interrogantes siendo una de las principales la

superovulación en las donantes y los factores que influyen en la misma, así como la calidad de los embriones obtenidos Varizanga *et al.*, (1993).

En América latina y particularmente en México la tecnología de la transferencia de embriones (T.E.) no ha sido lo suficientemente difundida para utilizarla como una practica rutinaria, las razones, entre otras, pueden estar dadas por problemas económicos, desconocimiento de los beneficios de su aplicación, manejo inadecuado de los programas reproductivos convencionales, alimentación deficiente y a la competencia entre los especialistas que sin difundirlo, han tenido la oportunidad de adquirir conocimientos y habilidades para su aplicación (Leyva *et al.*, 1999)

La superovulación es el termino mas comúnmente utilizado para referirse a la inducción de las ovulaciones múltiples (ya que la vaca es un animal uníparo y por lo tanto generalmente libera un solo óvulo durante el ciclo estral).

La superovulación constituye uno de los elementos mas importantes, pues la eficiencia de su aplicación practica depende en gran medida de la producción de embriones transferibles que se obtengan de cada hembra superovulada, actualmente, en el ámbito internacional la superovulación en la vaca se basa en la administración exógeno de varias gonadotropinas encontrándose entre las mas utilizadas la eCG y la FSH-p (Leyva *et al.*, 1999)

Los resultados de la superovulación están influenciados por varios factores que van desde los factores individuales del animal hasta otros como el clima, la raza, la alimentación, el tipo y dosis de la hormona, el periodo del ciclo estral en que se aplique el tratamiento superovulatorio, el estado reproductivo del animal, la edad y la salud de las donantes y las receptoras y otros factores del manejo. Madan, (1990).

Es por ello que la superovulación no puede verse como un hecho aislado, sino que se basa en toda una serie de acontecimientos fisiológicos del animal que parten desde el ciclo estral hasta la respuesta obtenida y que en gran medida son los responsables que esta sea de calidad (Caral, 1985) la eficiencia de esta técnica (transferencia de embriones) solo puede ser mejorada a medida que aumenten los índices superovulatorios de las donantes seleccionadas lo cual permitirá obtener el máximo de descendientes de estos animales. Sin embargo, la superovulación sigue siendo una limitante en la tecnología de la transferencia de embriones en la ganadería doméstica.

Ha habido muchos intentos de definir las bases de tales variabilidades en cuanto a la respuesta superovulatoria; estos incluyen estudios de la calidad de la respuesta superovulatoria, por una parte, y estudios de los factores que influyen en la respuesta ovárica por el animal, de la otra.

En general, se ha intentado estudiar los factores que pueden intervenir en la respuesta superovulatoria en los animales domésticos, donde diferentes investigadores plantean que el tipo de hormona empleada juega un papel importante sobre la respuesta ovárica y la calidad embrionaria en donantes superovuladas (Goulding *et al.*, 1991; Bono *et al.*, 1991). Al respecto Alcalá *et al.*, (1992) señalaron que con la FSH se obtienen mejores resultados, sobre todo en lo que se refiere a la calidad embrionaria en comparación con el uso de la eCG para inducir la superovulación.

Por otra parte los altos costos de la transferencia de embriones es otra limitante en la producción animal (Leyva *et al.*, 1999). Es por ello que se buscan nuevas alternativas para abaratar costos, las dos principales gonadotropinas utilizadas en los programas de comerciales de transferencia de embriones son los preparados de la hormona folículo estimulante (FSH) y la gonadotropina coriónica equina (eCG), sin embargo, esta última hormona, a pesar de tener algunas ventajas con relación a los preparados de FSH, como es su fácil obtención, bajo

costo relativo, y la fácil aplicación. No se utiliza en algunos países por diferentes razones, entre ellas se encuentra la pobre proporción de embriones de buena calidad dada fundamentalmente por su larga vida en sangre cuando se administra por vía intramuscular, promoviendo el crecimiento continuo de nuevos folículos, aumentando así los niveles de 17 beta estradiol (Alfurajju *et al.*, 1993), también por esta razón es que en la mayoría de los esquemas de tratamiento superovulatorio con eCG se utilizan anticuerpos después de su aplicación, para neutralizar este efecto residual.

Por todo lo mencionado anteriormente, como es, la poca difusión que tiene esta técnica y las grandes ventajas que ofrece al ganadero la aplicación de la transferencia de embriones, surge la inquietud de realizar una recopilación bibliográfica de los avances en la materia, tomando en cuenta los principales factores que influyen en la técnica de la transferencia de embriones y que impiden que se desarrolle con éxito.

II.- RECOPIACIÓN BIBLIOGRAFICA.

2.1.- Factores que afectan la respuesta superovulatoria

Durante la última década y en la actualidad una de las mayores limitantes que impide un uso más amplio de la transferencia de embriones es la gran variabilidad que se obtiene en los tratamientos superovulatorios. De acuerdo con Greve *et al.*, (1995), la inyección de gonadotropinas exógenas es todavía el único medio práctico para obtener múltiples ovulaciones, embriones y descendientes de vacas donantes y aunque se ha tratado de estandarizar, la variabilidad entre los resultados mediante diversos procedimientos persiste, ilustrando al respecto este argumento el hecho de que todas las donantes que se someten a la sobre estimulación ovulatoria, entre un 15 y 20 % no producen embriones transferibles (Foote y Ellington, 1988).

Lindsell *et al.*, (1986); y Goulding *et al.*, (1990); Driancour, (2001) estos autores coinciden en que algunos de los factores que pueden hacer variar la respuesta superovulatoria de una donante son múltiples y muchos de ellos han sido investigados por separado por diferentes autores y en varias regiones del mundo donde se utiliza la transferencia de embriones. Dentro de los más importantes se destacan la respuesta superovulatoria, la fase del ciclo estral en que se encuentra la donante al momento de iniciar el tratamiento, (Moniaux *et al.*, 1983; Hill *et al.*, 1985; Sugano y Shinogi, 1999) tipo de gonadotropina utilizada, (Varizanga, 1993) menciona, a la edad y número de partos de la donante (Caral *et al.*, 1988) dice que los factores genéticos, la época del año, el nivel de producción Láctea de la donante, días postparto para iniciar el tratamiento, manejo y estado sanitario de las donantes.

Entre los factores antes mencionados como modificadores de la respuesta a la superovulación con gonadotropinas queremos tratar algunos de ellos de acuerdo a lo investigado en los últimos años.

2.1.1.- Momento del ciclo estral en que se inicia el tratamiento.

La transferencia de embriones cobra cada día mayor importancia en la actividad de los veterinarios especialistas en reproducción, en los últimos años se han conseguido superar muchas barreras en determinados aspectos relacionados con el éxito en la utilización de esta técnica, como son los relacionados con los métodos de recogida y transferencia de los embriones, el cultivo y conservación a largo plazo de estos, sin embargo, uno de los campos en que menos se ha evolucionado ha sido en el momento idóneo para iniciar el tratamiento superovulatorio, con el fin de conseguir que el mayor número de animales tenga una alta respuesta superovulatoria Díaz *et al.*, (1999).

La mayor parte de los tratamientos superovulatorios actuales, independientemente de la gonadotropina utilizada, se comienzan en la fase media luteal (día 9-13) del ciclo estral (Lindsell *et al.*, 1986; Goulding *et al.*, 1990). Los estudios realizados con ultrasonido en vacas y vaquillas demostraron que el ciclo estral tiene de 2 a 3 oleadas foliculares (Roche y Boland, 1991), pero según Taylor y Rajamahendran (1991) la norma parece ser solamente dos para las vacas, estos mismos criterios son sostenidos por Figueredo *et al.*, (1997) quienes encontraron en novillas Nelore y Angus el predominio de dos ondas foliculares. Mas recientemente Loayza (1999) reporta una mayor incidencia de ciclos estrales con tres oleadas respecto a los de dos ondas en vacas mestizas.

En trabajos previos a esta recopilación, se había intentado iniciar el tratamiento en diferentes momentos del ciclo estral; sin embargo, los resultados son contrastantes. Al respecto Lindsell *et al.*, (1996) reportaron un incremento significativo de la respuesta superovulatoria y de la calidad de embriones transferibles al comenzar el tratamiento con FSH en el día 9 del ciclo, comparado con aquellas hembras que lo recibieron el día 3 o 6 del ciclo estral. Por otro lado, Goulding *et al.*, (1990), en el ganado de carne tratado con FSH observaron una

respuesta superovulatoria mas baja, cuando éste se efectuó en el día 2 del ciclo comparado con aquellas que lo recibieron el día 10.

Bungartz y Nieman, (1994); Fricke *et al.*, (1994). Han comprobado la determinante influencia que tiene la presencia de un folículo dominante en la respuesta S.O. que es mayor cuando el folículo no tiene capacidad de dominancia funcional sobre el resto de los folículos susceptibles de responder a las hormonas exógenas, en el momento de iniciar el tratamiento.

Al iniciar el tratamiento dentro de la fase luteal de 8 a 14 días del ciclo estral, numerosos autores plantean que no existen grandes diferencias en cuanto a resultados, pero todos coinciden en que las mejores respuestas son obtenidas al aplicar la eCG entre el día 10 y 12 del ciclo (Iglesias, 1978; Hasler *et al.*, 1983; De Armas *et al.*, 1985; Saumande y Chupin, 1986; Ali dinar *et al.*, 1987).

En 1983, Moor *et al.*, (citado por Varizanga, 1993) explicaron que la inyección de gonadotropinas en los días 8 y 10 producen las mayores respuestas ováricas, al apreciar que en este momento existen el mayor numero de folículos antrales de medio tamaño que son los que responden mas favorablemente a la estimulación.

Caral *et al.*, (1988) al analizar la respuesta superovulatoria de acuerdo al día del ciclo ($p < 0,05$) sobre los porcentajes de embriones fertilizados, los mejores resultados se obtuvieron al trabajar con las donantes entre los días 10 y 11 del ciclo estral con 10,6 ovulaciones y 5,6 embriones por vaca y porcentajes de fertilización y de embriones transferibles de 83,5 y 69,2 % respectivamente.

El examen ecografico de los ovarios antes de iniciar la superovulación permite comprobar la presencia o no de un folículo dominante, pero una sola observación no es suficiente para asegurar si existe dominancia funcional o esta

es tan solo morfológica (Saumande, 1995). Esto indica que sería necesario un seguimiento ecografico a lo largo de varios días para comprobar que el folículo dominante, presente en uno de los ovarios, esta aún en fase de crecimiento y, por lo tanto, con capacidad de inhibir el crecimiento de los demás folículos, condición esta que no se puede llevar a cabo en muchos casos a nivel practico.

La transición entre el final de la primera y el principio de la segunda oleada folicular del ciclo estral no es igual en todos los animales y, ni siquiera, entre los distintos ciclos estrales de una misma vaca. Sin embargo, en la mayoría de los casos la atresia del primer folículo dominante y el inicio del crecimiento del segundo se produce entre el día 8 y el 11 después de la ovulación en los ciclos estrales con dos oleadas foliculares y, como media, un día antes en los de tres oleadas (Grinther *et al.*, 1989). Cabe suponer, que es mas fácil que se encuentre presente un folículo funcionalmente dominante cuando se inicia el tratamiento superovulatorio en el día 8 del ciclo que en el día 12 Díaz *et al.*, (1999).

No se han encontrado muchos autores que hacen referencia a diferencias en la respuesta entre los distintos días de inicio del tratamiento (en el intervalo de los días 8 a 14 del ciclo estral), parece que si existe una cierta tendencia a que aumente la tasa de ovulación cuanto mas tarde se empieza el tratamiento (Staigmiller *et al* 1992) y a que los resultados sean superiores en el día 12 en términos de numero de embriones transferibles recolectados.

De ruigh *et al.*, (1995). Aunque algún autor ha situado la mejor respuesta al iniciar el tratamiento en el día 9 del ciclo estral (Lindsell *et al* 1986), la mayoría ha observado un incremento en los resultados a partir del día 10 (Lerner *et al.*, 1986; Goulding *et al.*, 1990; Staigmiller *et al.*, 1992)

Díaz *et al.*, (1999) Realizaron un trabajo experimental en el cual 32 vacas de la raza holstein-friesian fueron sometidas a un tratamiento superovulatorio con FSH en el cual las vacas fueron divididas en dos grupos de 16 vacas cada uno, en

un grupo el tratamiento superovulatorio fue iniciado el día 8 del ciclo estral (grupo A) y en el otro el día 12 del ciclo estral (grupo B) Donde reporto que en los animales en los que se inicio el tratamiento en el día 12 del ciclo estral (grupo B) tanto la respuesta superovulatoria como el numero total de embriones recogidos y el numero de embriones transferibles fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los resultados obtenidos en los animales en los que el tratamiento se inició en el día 8 (grupo A).

Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores, que observaron un incremento en los resultados a partir del día 10 (Lerner *et al.*, 1986; Goulding *et al.*, 1990; Staigmiller *et al.*, 1992) y en especial con el trabajo de Ruigh *et al.*, (1995) que comprueba una significativa mejoría al iniciar el tratamiento en el día 12 del ciclo estral en términos de numero de embriones transferibles recogidos.

Díaz *et al.*, (1999) indica que no solo es importante que el numero medio de embriones transferibles sea elevado, sino que también participen en esta cifra la mayor parte de los animales tratados. Ya que en el grupo A, cuatro animales no dieron ningún embrión transferible, mientras que en todos los animales del grupo B se obtuvo alguno. Además, de entre los del grupo A, solo seis dieron tres o más embriones transferibles repartiéndose entre ellos el 71% del total de los embriones de su grupo. En el grupo B fueron once las donantes en las que se recogieron tres o más embriones transferibles, lo que significa que en este último grupo la respuesta fue más homogénea.

Díaz *et al.*, (1999) analizando los resultados obtenidos tras las transferencias de embriones a las receptoras, el porcentaje de gestaciones es significativamente superior ($p < 0,05$) con aquellos procedentes de las donantes del grupo B esto podría ser un indicativo de que no solo hubo diferencias en el total de embriones que morfológicamente presentaban características de normalidad, sino que una parte de los embriones considerados como transferibles

entre los procedentes del grupo A podrían tener comprometida su capacidad de desarrollo posterior.

El inicio del tratamiento superovulatorio en un momento en el que el folículo dominante mantiene dominancia funcional, puede llevar a que la gonadotropina exógena estimule el reclutamiento de folículos destinados a la atresia, lo que conlleva a que una parte de los ovocitos no sean fecundados (Desaulniers *et al.*, 1995), disminuya el porcentaje de recogida (Fricke *et al.*, 1994) y una parte importante de los cigotos producidos tras la superovulación presenten anormalidades (Assey *et al.*, 1994)

2.1.2.- Factores inherentes a la hembra.

a) Edad de las donantes:

Según Brand, (1978) las respuestas ováricas declinan al aumentar la edad de los animales debido al decrecimiento del número de folículos preovulatorios presentes en el ovario.

Al analizar los efectos de la edad de las donantes, en la superovulación, Leren *et al.*, (1986) hallaron que el número de embriones, los índices de fertilidad y el número de embriones transferibles decreció significativamente ($p < 0.05$) al avanzar la edad del animal, concluyendo que el incremento de la edad de la donante tiene una influencia negativa en el proceso de la ovulación.

Moore (1975) realizó varios tipos de tratamientos superovulatorios en novillas de 14- 18 meses de edad y en vacas fértiles de más de 8 años de edad y observó que el número de ovocitos fertilizados y embriones recolectados era mayor en las novillas que en las vacas. Por lo tanto él concluyó que estas diferencias eran por causa de la caída de los ovocitos de los ovarios por envejecimiento.

Caral *et al* (1985) analizaron diferentes factores que afectan la superovulación en los cuales la edad de la donante tuvo un efecto altamente significativo sobre la fertilización de los embriones logrando los mejores índices en animales entre 1 – 4 años. Aunque la relación entre el descenso en la efectividad del tratamiento superovulatorio y la vejez de la vaca no ha sido claramente esclarecida, el número de ovocitos ovulados es esperado a descender en vacas viejas que tienen mayor edad a 10 años (Newcomb, 1978).

b) Número de partos.

Miguet, 1982 (citado por Varizanga, 1993) señaló que los índices superovulatorios están sometidos a numerosos factores de variación en los que el número de partos de las donantes juega también un importante papel.

Caral *et al.*, (1988) hallaron un efecto significativo del número de partos ($P < 0,05$) sobre los porcentajes de embriones transferibles, los índices más altos se obtuvieron en 0 partos con 72,4 %.

c) Raza de la donante.

Existe una notable diferencia en la respuesta hormonal entre los animales y probablemente esta dada por una mayor sensibilidad de los ovarios entre una raza y otra (Mariana *et al.*, 1970) y que los cruces frisian tienen ante la administración de eCG una respuesta más baja que la raza charolais.

Mauleon, (1974) asegura que las razas bovinas presentan diferencias en cuanto a la abundancia de folículos primordiales.

Shea *et al.*, (1976) compararon los números de ovocitos ovulados en diferentes razas: simmental, limousin, chianina y maine-anjou (eran razas de carne o de doble propósito) donde los resultados fueron 15,2; 13,6; 12,4 y 9,9 respectivamente.

Rodríguez y Gregory, (1986) con el objetivo de aumentar el número de embriones viables por vacas donantes, superovularon animales de la raza Hereford y Holstein con una dosis de 30 mg.de FSH logrando porcentajes de fertilización de embriones de 72.0 % en la raza Hereford y 64,6 % en la raza Holstein, respectivamente.

d) Nivel nutricional.

El estado nutricional en que se encuentran los animales al someterse a una estimulación hormonal es decisivo para la respuesta esperada, siendo aconsejable que esta estimulación sea acompañada de un incremento de los niveles energéticos para garantizar una respuesta de calidad, pues esta también demostrado que una alimentación deficiente atenta sobre la respuesta ovárica Caral y Del sol, 1988 (citados por Varizanga, 1993)

Hill *et al.*, (1970) indicaron que la mala alimentación afecta el crecimiento de los pequeños folículos y, especialmente de los folículos grandes después de los 15 días del ciclo estral.

Aughtry, (1987) señala que la alimentación de las hembras donantes debe garantizar los requerimientos mínimos de acuerdo con el estado reproductivo de las mismas, lo que depende enteramente del hombre; ya que el potencial genético no puede manifestarse si no existe un nivel nutricional aceptable.

Butter *et al.*, (1981) sugieren que el balance energético es sumamente importante en todos los eventos cercanos a la ovulación. Sin embargo, señala que otros autores no encontraron diferencias en el desarrollo y peso del cuerpo luteo de novillas con diferentes dietas.

e) Estado lactacional o productivo de la donante.

En las vacas lecheras Durrow *et al.*, (1982) reportaron que mas embriones fueron recolectados en las vacas lactantes que los recolectados en vacas fuera de la lactación, sin embargo, (Greve *et al.*, 1979), encontró resultados contrarios.

Lucy *et al.*, (1992) Expusieron que existen diferencias entre algunos aspectos de la dinámica folicular entre vacas lactantes y secas. Primero el numero medio de folículos de clase 2 (6 a 9 mm) reclutados durante la primera oleada folicular, es mas bajo en vacas lactantes que en no lactantes; segundo, el numero medio de folículos de clase 4 (>15 mm) era mayor en vacas lactantes que en no lactantes entre el día 8 y 17 del ciclo estral programado, el tamaño del folículo maduro de la primera, pero no de la segunda oleada, es mayor en vacas lactantes que en las no lactantes, llegando a la conclusión que el desarrollo folicular y la esteroidogénesis son aparentemente alteradas por la lactación.

2.1.3.- Factores ambientales.

a) Época del año, variaciones estacionales:

La vaca no es un animal que cicla en relación con la época del año que es el caso de la yegua que sus ciclos son estacionarios o la cabra y carnera que son fotoperiodicas varizanga (1993)

Sin embargo Trucker, (1982) planteo que las altas temperaturas (mayores de 27°C) tienen algunos efectos sobre el ciclo estral y la supervivencia de los embriones y que también la duración de la luz del día afecta la secreción hormonal y la concepción.

Gordon, (1975) señalo que algunas diferencias son observadas entre las vacas en finlanladiá, África del sur e irlanda, de acuerdo con las estaciones del año.

Shea *et al.*, (1976) hallaron que los niveles de ovulaciones por donante decayeron durante los meses de octubre a diciembre. Así mismo, Peters *et al.*, (1980) concluyeron que la estación del año es un factor mas importante que la lactación en cuanto ha el control de la actividad ovárica.

Cristser *et al.*, (1980) señalan que el verano es menos propicio para la superovulación por la afectación que se produce en los índices de ovulaciones al señalar que existen variaciones en los rendimientos superovulatorios en función al mes del año, siendo el numero de embriones bastante constante, pero el numero de ovulaciones es muy variable.

Caral, (1984) al contrario de lo que opina Shea *et al.*, (1976) llego ala conclusión de que los mejores resultados de superovulación se obtienen en la época de secas de (octubre a marzo), y que los animales holstein son los mas afectados por la época del año.

Varizanga, (1993) explica que el numero de los embriones fértiles no depende de la estación del año, ya que los factores adicionales involucran no solo a el clima sino una combinación de otros factores tales como el manejo y la nutrición en general. Lo que fue comprobado por Takahashi, 1983, (citado por el mismo Varizanga, 1993) al experimentar la superovulación en vaquillas, donde planteo que no hubo alguna diferencia entre el numero de embriones recolectados durante la época de secas y la época de lluvias.

No se debe confundir el manejo y la época del año, por ejemplo, el ayuno después de la aplicación de eCG causa un descenso en la respuesta superovulatoria (Lamond, 1970).

La época del año ha sido un factor de variación en la respuesta superovulatoria muy discutido (Varizanga, 1993) ya que en ellas se encuentran las influencias de la temperatura, la duración de las radiaciones solares e

intensidad, la humedad relativa las precipitaciones y la disponibilidad de alimentos; todo esto puede variar de un año a otro en las mismas estaciones (Massay y Oden, 1984).

Gordon *et al.*, (1987) y De Armas *et al.*, (1987) coincide en que en condiciones climáticas tropicales esto es un factor que parece cobrar una gran importancia, ya que generalmente en esta época de temperaturas mas altas es donde se registran la más bajas respuestas y se ve disminuida considerablemente la calidad embrionaria.

2.1.4.- Presencia de folículos dominantes al momento de iniciar el tratamiento.

Las características de la población folicular en el momento en que se inicia el tratamiento superovulatorio se asocia a la calidad de la respuesta (bergfelt *et al.*, 1997). así se ha dicho que el surgimiento de un folículo dominante, que al parecer inhibe el desarrollo de sus congeneres y los conduce a la atresia, posiblemente se debe a efectos inhibitorios de sustancias producidas por el mismo o por el folículo que domina (Ko *et al.*, 1991) de aquí que cuando se inicia el tratamiento superovulatorio en presencia de un folículo dominante activo la respuesta disminuye.

Algunos investigadores han correlacionado la presencia o no del folículo dominante al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio con la eficiencia del tratamiento, ya sea con FSH, Guilbault *et al.*, (1991) o eCG Huhtinen *et al.*, (1992) en estos estudios se ha encontrado que la ausencia de de folículos dominantes aumenta casi al doble la cantidad de embriones transferibles. Utsumi *et al.*, (1997) obtuvieron una mayor cantidad de ovulaciones cuando la ablación de los folículos dominante se realizo 48 horas antes de iniciar el tratamiento superovulatorio.

Goulding *et al.*, (1990) Dice que si al momento del ciclo estral al iniciar el tratamiento superovulatorio con gonadotropinas esta presente un folículo dominante este puede afectar los niveles de ovulación y producción embrionaria, disminuir la respuesta superovulatoria como se a reportado en algunos estudios (Bungartz y Nieman; 1994), en otros , estos argumentos no fueron confirmados (Wilson, (1990)

La presencia de un folículo dominante en el ovario inhibe el desarrollo de otros folículos Ireland y Roche, (1987) y esta supresión podría también afectar la respuesta superovulatoria. Por ejemplo se ha demostrado que la presencia de un folículo dominante denota la aparición y reduce el numero de folículos que son de mas de 7mm de diámetro durante el tratamiento superovulatorio, y esto es asociado con una reducción en el numero de ovulaciones (Grasso *et al.*, 1989)

En otros reportes (Rouillier *et al* 1990; Guilbault *et al.*, 1991) sostienen que la presencia de un folículo dominante al tiempo del tratamiento superovulatorio podría alterar los procesos de dominancia de folículos reabsorbibles y su respuesta a la estimulación con gonadotropinas. También (Bungartz y Niemann, 1994) indican que la presencia de un folículo dominante disminuye el periodo de ovulación y el número de embriones transferibles.

Huhtinen *et al.*, (1991) reportaron sobre unas vacas que recibieron un tratamiento con eCG inyectada cuando no hubo presencia de un folículo dominante en sus ovarios, produjeron significativamente mas embriones buenos (transferibles) que aquellos que recibieron eCG en la presencia de un folículo dominante. Esto fue verdadero bajo clasificación de dominancia. La ausencia de un folículo dominante al tiempo del tratamiento con eCG se encontró un número significativamente mas alto de embriones y oocitos recuperados.

Huhtinen *et al.*, (1991) dijo que en la ausencia de un folículo dominante al tiempo de la inyección con eCG las vacas produjeron dos veces el numero de

embriones transferibles comparado a los tratados con eCG en la presencia de un folículo dominante, y que los porcentajes de oocitos no fertilizados y embriones degenerados fueron mas bajas en las vacas sin un folículo dominante al tiempo de la terapia gonadotrópica.

Algunos estudios en esta área han dado resultados similares ((Grasso *et al.*, 1989, y Guilbault *et al.*, 1991) mientras que otros han fallado para demostrar algún efecto significativo de la presencia de un folículo dominante sobre la respuesta ovárica a la terapia hormonal (Wilson *et al.*, 1990; y Gray *et al.* 1991).

Wilson *et al.*, 1990; y Gray *et al.*, (1991) ambos reportaron que la respuesta superovulatoria no pudo en la presencia de un folículo dominante. sin embargo, en el estudio de Wilson *et al.*, (1990) el estado de dominancia fue asegurado únicamente por un simple examen de ultrasonido para el día del tratamiento superovulatorio.

Es difícil definir un folículo dominante por sus características morfológicas solamente des de que el folículo dominante permanece como el mas grande en los ovarios por 3-4 días después de que ha pasado su fase de dominancia (Fortune *et al.*, 1988). Por esta razón muchos investigadores han estipulado que la revisión de pos folículos diaria es esencial cuando se llevan estudios que involucran dinámicas foliculares en la vaca.

(Ginther *et al.*, 1989; y Guilbault *et al.*, 1991) Otros han tratado de diagnosticar el folículo dominante por una simple evaluación y han fallado en encontrar alguna correlación entre la etapa de crecimiento folicular y el inicio de la estimulación gonadotropina y la subsecuente respuesta superovulatoria (.Wilson *et al.*, 1990)

Huhtinen *et al.*, (1991) asegura que en los resultados de sus estudios demostraron convincentemente que la presencia o ausencia de un folículo

dominante en los ovarios al tiempo de la estimulación gonadotropina exógeno influye marcadamente la respuesta superovulatoria en la vaca.

2.1.5.- Tipo de gonadotropina como factor en la respuesta superovulatoria.

Al realizar una superovulación el tipo de hormona utilizado presenta variaciones, tanto la gonadotropina corionica equina como la hormona estimulante de los folículos presentan sus ventajas e inconvenientes propios, que hacen la elección de una de ellas como agente estimulante ideal, un tema de interesantes controversias (varizanga, 1993). También afirmo que uno de los principales problemas en tratamiento superovulatorio inducido con FSH es, el numero de aplicaciones a suministrar, pues la vida media en sangre de esta hormona es muy corta (110 minutos) por lo que para una estimulación superovulatoria resulta necesario el suministro repetido de la misma, para mantener un nivel continuo en sangre que garantizara la acción de esta sobre los folículos ováricos.

Varizanga (1993) encontró que los resultados en el tratamiento con FSH fueron superiores a los resultados obtenidos con el tratamiento de eCG. Tomando en cuenta la respuesta ovárica, superovulatoria y calidad embrionaria.

Numerosos autores plantean que la eCG por su larga vida en sangre permite que sea administrada en una sola dosis, obteniéndose el desarrollo folicular deseado. Así disminuye el efecto estresante del tratamiento continuo con FSH. Pero esta misma ventaja que presenta la eCG es la principal causa de su desventaja, ya que su larga permanencia en sangre produce desordenes en la fase de maduración de los folículos (Bervers y Dieleman, 1987)

Al comparar la FSH y la eCG Boland *et al.*, (1991) menciona que la eCG es menos costosa y su aplicación requiere menor numero de inyecciones lo que hace este método mas sencillo en comparación con las ocho inyecciones necesarias en los tratamientos con FSH, aunque esta no tiene la desventaja de

seguir estimulando a la población folicular como es el caso de la eCG provocando un estatus inadecuado para los embriones derivando en una pobre calidad embrionaria al momento del lavado.

Algunos autores como (Hasler *et al.*, 1983; Greve *et al.*, 1984; Mapletoft, 1987) opina que en la superovulación con FSH se logra mayor numero de cuerpos luteos, embriones recolectados y embriones transferibles en comparación con la eCG al estudiar el efecto de la FSH y la eCG sobre la respuesta ovárica.

Alcala *et al.*, 1989, (citado por Varizanga, 1993) hallaron que los resultados obtenidos en el tratamiento con FSH fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los alcanzados en el tratamiento con eCG en lo referente a: numero de ovulaciones (7,8 y 4,2), embriones fertilizados (4,3 y 1,4) y numero de embriones recolectados (5 y 1.8), numero de embriones transferibles (4,1 y 1,2) sin embargo, la mayoría de los estudios empleados la FSH para la superovulación indican que este tratamiento no resulta en mas embriones transferibles, probablemente por que los niveles de la LH son frecuentemente inducidos muy temprano o muy tarde para vacas individuales.

Morales, (2001) comparo la respuesta superovulatoria y algunos parámetros entre la gonadotropina corionica equina (eCG) administrada por vía aorta abdominal y un preparado de FSH (pluset) obteniendo resultados que indican que la eCG administrada por vía aorta abdominal es una alternativa en los tratamientos superovulatorios en vacas, ya que en cuanto al porcentaje de calidad embrionaria fue mejor que la FSH-p y también fue menor el porcentaje de embriones no transferibles, este mismo autor confirma que por esta vía no es necesaria la neutralización del efecto residual de la eCG como es común cuando se utiliza por vía intramuscular y entonces si se pueden disminuir los costos del tratamiento superovulatorio.

Jainudeen *et al.*, (1966) encontraron por primera vez, que en el suero sanguíneo de animales tratados con eCG repetidamente aparecía una sustancia que inhibía la actividad biológica de la eCG .

El principio de acción biológica de este antisuero/ anticuerpo es de su combinación con la eCG circulante, que queda libre después de haber cumplido su misión superovulatoria. Debido a su larga permanencia en sangre (vida media hasta 5 días) trae consigo resultados indeseables tales como crecimiento de nuevos folículos, con el consiguiente incremento de los niveles de 17β estradiol que provoca un estatus inadecuado para los embriones y parece ser la causa fundamental de los problemas de la calidad embrionaria en la superovulación con esta hormona (Saumande *et al.*, 1984).

Mariam, (1993) Se ha intentado la aplicación de un suero inmune contra la eCG (anti-eCG) el cual se inyecta en el animal donador durante el tratamiento superovulatorio para que ayude a obtener respuestas ováricas de mejor calidad, para disminuir el efecto negativo de la eCG en el desarrollo embrionario temprano.

De Armas *et al.*, (1987) emplearon satisfactoriamente un tratamiento superovulatorio a base de eCG, GnRH y anti-eCG en vacas holstein con el que alcanzaron una media de 7,4 embriones transferibles contra 4,8 en el grupo de no tratados.

Mo et al (1985) encontraron que con la aplicación de antisuero monoclonal contra eCG en vacas superovuladas con 3000 U.I. de esta hormona, Presentaron menos folículos anovulatorios y mejores niveles de fertilización.

(Holy, 1987; Mapletoft *et al.*, 1990; Boland *et al.*, 1991) coinciden en que el empleo de la anti-eCG inyectado en el estro en animales tratados con eCG incrementa los resultados en cuanto a embriones transferibles y los iguala a los

obtenidos por preparados comerciales de la hormona estimulante de los folículos (FSH) y en comparación con la gonadotropinas hipofisarias, es menos costosa y mas fácil su empleo.

Ungerfeld *et al.*, (1995). Encontraron que el uso de antisuero contra eCG en tratamientos superovulatorios en ovejas, disminuye el numero de folículos grandes anovulatorios, aumenta el numero de C.L. y mejorar la calidad de los embriones recuperados

Barraza, (1997) señala que la aplicación de anti-suero monoclonal contra la eCG en 24 horas después de la presentación del estro y 20.55 +/- 4.66 horas después del pico preovulatorio de LH muestra buenas perspectivas en la eficientización de la superovulación al mejorar la calidad embrionaria y la respuesta superovulatoria, al incrementar la calidad de embriones transferibles recuperados y al disminuir la cantidad de folículos grandes al momento del lavado uterino.

Leyva *et al.*, (1999) asegura que la utilización de anti-eCG en los tratamientos superovulatorios con eCG, es efectivo para neutralizar la actividad de esta hormona, pero hasta el momento no se ha corroborado su beneficio con toda certeza en cuanto al numero de embriones recolectados y a su calidad.

2.2.- Gonadotropinas más utilizadas en la superovulación.

En los bovinos una superovulación (poliovulación) puede ser provocada por diferentes preparados de actividad gonadotropina tales como el polvo hipofisario, extracto de glándula pituitaria del ganado porcino, ovino y equino y la orina de mujer menopausica pero generalmente las gonadotropinas mas comúnmente utilizadas son; la eCG y la FSH de origen porcino ó ovino debido a la

disponibilidad , bajo costo relativo, efectividad y fácil uso en la que se necesita una sola inyección de eCG ha sido extensamente usada para la superovulación en ganado, la vida media en sangre de la eCG excede por mucho a la vida media de la FSH (Elsdén *et al.*, 1978).

La larga vida en sangre de la eCG, frecuentemente induce un crecimiento folicular extra durante la primera oleada folicular post ovulatoria, lo que resulta en un incremento de los niveles de estradiol en sangre lo cual puede tener un efecto negativo sobre el desarrollo embrionario temprano (Alfurajji 1993).

La primera referencia existente sobre la Gonadotropina corionica equina (eCG), también conocida como gonadotropina del suero de yegua preñada (pregnant mare serum gonadotrophin; PMSG) proviene de Cole y Hart, 1930 (citados por Ungerfeld, 1998) quienes administraron suero de yegua gestante a ratas prepubes y observaron que producía madures sexual acompañada de un aumento del peso ovárico.

Ungerfeld, (1998) afirma que este primer reporte sobre la existencia de la eCG describe con gran acierto varias características de la hormona, tales como su efecto ovariotrófico.

En 1940 se comienza a aplicar en superovulación en ratas, obteniéndose superfecundidad, Esto abrió campo a toda línea de aplicación de la eCG en tratamientos de inducción de la superovulación (Ungerfeld, 1998)

Nett, et al., (1975) dice que los niveles de eCG en la yegua comienzan a ser detectables en sangre entre los 32 días, Kindahl, et al., (1982) que a los 40 días de gestación, pudiendo encontrarse en circulación hasta los 140 (Kasper, et al., 1987) y (Roser y Lofstedt, 1989) asegura que hasta los 200 días de gestación.

En el día 80 se encuentran los niveles máximos de eCG circulantes, siendo estos de unos 6 mg/1 (Papkoff, 1981). En algunos animales este pico se mantiene por un cierto tiempo, mientras que en otros, luego de alcanzarlo tempranamente, los niveles comienzan a decaer, La tasa de desaparición de la hormona en el suero es muy baja durante el 4° y 5° mes de gestación lo que no necesariamente indica el mantenimiento de una alta secreción activa (Cole, et al., 1967).

La dinámica de la secreción puede correlacionarse con la del desarrollo de una estructura endometrial especializada (Brendemuehl, et al., 1996). Entre los días 10 y 30 (Liao y Pierce, 1970) de gestación, comienza a aparecer en el útero grávido de la yegua, alrededor del "conceptus" (embrión, membranas embrionarias y líquidos embrionarios), estructuras pequeñas, de aspecto ulceroso yuxtapuestas al corion, denominadas copas endometriales (Ungerfeld, 1998)

(Clegg, et al., 1954). Encontró que inicialmente aparecen como pequeñas erupciones localizadas en el endometrio, que mide desde unos pocos milímetros de 5 – 10 cm. de diámetro. Hacia los días 70- 80 de gestación y a medida que van creciendo por su zona periférica empiezan a regresar en las regiones centrales, tornándose cóncavas y haciéndose localizadas y de aspecto caseoso. Su superficie se ve llena de una secreción exocrina de aspecto viscoso y de color miel (Yamauchi, 1975), que puede contener hasta 1,000,000 de UI de eCG por gramo de tejido, posteriormente entre los días 100 y 140 de gestación dichas estructuras comienzan a degenerar (Ungerfeld, 1998)

(Liao y Pierce 1970), exponen que puede encontrárseles necrosadas con su secreción exocrina libre en el lumen uterino. Las porciones apicales de las copas son destituidas durante el desarrollo temprano, pero sus regiones basales comienzan a distenderse debido a la acumulación de secreciones.

La eCG tiene acciones similares a las de la LH Y FSH, las acciones semejante a la LH incluyen, estímulo de las células intersticiales del ovario, inducción de la ovulación y luteinización de la células de la granulosa, mientras que en su acción similar a la FSH, la eCG actúa como un potente estimulante del crecimiento ovárico y aumenta los niveles de estradiol en sangre producto r de la reacción folicular (Cole y cupos, 1984).

Los primeros ensayos en Supérovulación empleaban la eCG aplicada durante la fase final del ciclo estral, acompañada o no de gonadotropina criónica humana (HCG) Gordon (1975) estos procedimientos ofrecían resultados muy variados en cuanto a la presentación del estro después del tratamiento, porcentaje de respuesta y calidad de los embriones obtenidos.

La gonadotropina corionica equina (eCG) procedentes del suero sanguíneo de yeguas preñadas, no por el echo de obtener mejores resultados que en los otros productos si no por su fácil obtención, aplicación y por ser la mas económica.

La FSH. Fue aislada en el año de 1940 por Li *et al.*, de la hipófisis de la oveja, y mas tarde de la puerca y de la yegua (Derivaux, 1961; Holy, 1987) ellos plantearon que la hipófisis de la yegua es la fuente mas rica de esta hormona y que químicamente es una glicoproteina que tiene un peso molecular de 29,000 daltons en el cerdo, 30,000 en la vaca, 32,000 en la oveja y 34,000 en el ser humano su vida media en sangre es de 2 a 4 hrs. (García, et al., 1995).

La secuencia estructural de los aminoácidos de dicha hormona no se encuentra completamente aclarada, lo cual hasta la fecha no se ha esclarecido, solo se acepta la hipótesis de que para la actividad biológica de la misma es decisiva la parte glucosida que coincide con la existencia de la cisteina Ellender, 1974 (citado por Holy, 1987)

La FSH Contiene dos cadenas peptídicas denominadas alfa y beta, siendo la cadena alfa idéntica en la LH, FSH y TSH. (garcía, et al., 1995)

La FSH estimula la gametogénesis en ambos sexos, en el macho su acción testicular sobre las células de sertoli potencia la espermatogénesis, también actúa incrementando los receptores de las células de leydig, potenciando así la acción de la LH, en el ovario actúa sobre células de la granulosa y estimulando la síntesis de estrógenos y el desarrollo folicular. (García, et al., 1995).

La FSH es producida por las células bazofias situadas en el área medular de la adenohipofisis, su acción biológica es estimular el desarrollo folicular en los estadios preovulatorios, incrementando la síntesis de proteínas especialmente en las células de la teca interna (Barid, 1972).

Hirshfield et al, (1978) confirman la acción folículo estimulante de esta hormona al plantear que el incremento en el número de pequeños folículos después del estro es el resultado del efecto de la descarga preovulatoria de FSH, lo cual a sido observado en la vaca.

Doff et al., (1979) menciona que el mecanismo por el cual la FSH causa un incremento folicular extra y superovulatorio está relacionado con la prevención de la atresia folicular, lo cual según Caeson et al., (1979) se debe a que la FSH estimula la producción de los receptores de la misma en las células de la granulosa, lo cual a su vez incrementa la actividad de la enzima aromática.

En 1978 Thimonier, planteo que la FSH actúa estimulando la mitosis de las células de la granulosa, con el consiguiente incremento del tamaño del folículo y secreción de estrógenos, que actúa como mecanismo de retroalimentación por la liberación de la hormona luteinizante (LH) indispensable para la maduración y ovulación folicular.

La hormona folículo estimulante de origen porcino (FSH-p) de la hipófisis del mismo, Caral y Bernal, (1988) es también utilizada en la superovulación cada una de estas presenta sus ventajas y desventajas propias, que hacen la elección de una de ellas como agente ideal, un tema de interesantes controversias.

La hormona folículo estimulante induce una respuesta superovulatoria más uniforme y preferible que la obtenida con la eCG. Elsdén *et al.*, (1978) al respecto, Halleg *et al.*, 1979 (citado por Varizanga, 1993) superovularon 122 vacas Brahman con FSH utilizando una dosis entre 36-48 mg + prostaglandina F2 alfa (40 mg) y el 82% de los animales dieron embriones, encontrando efectos significativos ($p < 0.05$) para las dosis de hormonas utilizadas.

Siguiendo los conocimientos fisiológicos sobre la sinergia entre FSH y LH se comenzó con el empleo de combinaciones de ambas en la Superovulación de hembras bovinas, pero las investigaciones realizadas por Chupin *et al.*, 1984; Armstrong y Opovsky, (1986) demostraron el efecto negativo de un exceso de LH en la Superovulación ya que la hormona FSH comercial por sí se encontraba contaminada con niveles importantes de LH; de tal forma se eliminó el suministro de extra de LH.

Donaldson y Ward, (1985 y 1987) realizaron trabajos sobre la purificación de la FSH y obtuvieron resultados significativamente superiores en cuanto a niveles de fertilización de embriones obtenidos por los preparados con menor cantidad de LH.

Uno de los principales problemas en el tratamiento Superovulació inducidos con FSH ha sido el número de dosis a suministrar, pues la vida media de esta hormona es muy corta (110 minutos) por lo que para una estimulación ovulatoria resulta necesario el suministro repetido de la misma; para mantener un nivel continuo en sangre que garantizara la acción de esta sobre los folículos ováricos. La comparación de los resultados obtenidos al montar el tratamiento

por 4 o 5 días no han mostrado influencias negativas en la Superovulación (Soler *et al.*, 1983; Warfield *et al.*, 1986),

Rodríguez y Gregory, (1986) encontraron que al igual que con la aplicación de PG a las 48 ó 72 hr. De iniciado el tratamiento al emplear el esquema de 5 días de duración, En dicho esquema la aplicación de la dosis de 250 mcg. de PG coincido con la inyección de FSH a las 48 y 60 hr. de iniciado el tratamiento y los resultados de esto fueron mejores que los obtenidos al aplicar (una sola dosis) dosis única de 500 mcg. En cuanto al numero de embriones recolectados.

Monniaux *et al.*, (1983) encontraron que la frecuencia de inyecciones de la FSH influyen en los resultados de la Superovulación al realizar una experiencia donde se suministraron dosis de 32 y 50 mg de FSH divididas en cantidades iguales durante 4 días, y la dosis diaria fue inyectada en 1,2,3 ocasiones, obteniendo en la frecuencia de 2 y 3 por día los mejores niveles de embriones transferibles.

Varizanga, (1993) Algunos autores también evaluaron la administración en dosis iguales o en forma decreciente, y comprobaron que la dosis decreciente lograba incrementar los índices de ovulación de $9,3 \pm 7,6$ a $15,9 \pm 15,0$ y de embriones transferibles de $2,4 \pm 3,6$ a $5,3 \pm 6,2$.

Hill *et al.*, (1985) trataron de disminuir el numero de inyecciones al mezclar 50 mg de FSH con gelatina y un vehículo salino administrándola subcutáneamente, donde los resultados obtenidos en comparación con la administración subcutánea durante 5 días a intervalos de 12 hr. Con la misma dosis dividida en partes iguales demostró que a pesar de no encontrarse diferencias en cuanto al numero de ovulaciones entre tratamientos, el numero de embriones totales y de transferibles fue de $6 \pm 1,2$ vs $2,4 \pm 5$ y $3,7 \pm 0,9$

vs $0,6 \pm 1,2$ a favor del grupo que recibió el tratamiento de 5 días en ambos parámetros.

2.2.1.- Esquemas de tratamientos superovulatorios con gonadotropinas.

Tomando en consideración todo lo que se ha planteado anteriormente alrededor del mundo se han desarrollado diferentes esquemas de tratamientos superovulatorios, según conveniencias y condiciones prevalentes en el momento de diseñar el experimento por cada investigador. Dado las diversas variabilidades que se conocen, se presentaran algunos esquemas de tratamientos superovulatorios.

Tratamientos superovulatorios con eCG.

Gielen *et al.*, (1990) diseñaron un esquema de tratamiento superovulatorio, para compara la eficiencia de la eCG +anti-eCG, el tratamiento superovulatorio se inicio entre los 9 y 14 días del ciclo estral con una inyección de 3000 UI de eCG (aplicada im) seguido por una inyección im de 3ml de prosolvin (análogo de PGF2 alfa) 48 hr. Después. Anti-eCG fue inyectada i.v. a las 8-12 hr. Después de comenzar el celo, los resultados indican que el tratamiento con eCG+antie- eCG puede ser exitosamente empleado ya que se obtuvieron un promedio de 4.6 embriones transferibles por vaca.

Varizanga, (1993) esquematizo un tratamiento con eCG iniciando entre los día 8 y 12 del ciclo estral en el cual ,los animales recibieron una dosis única entre 2,500 a 3,000 UI de gonadotropina corionica equina (eCG) por vía intramuscular, con una dosis de prostaglandina (PGF2 alfa) a las 48 horas del tratamiento con (eCG) obteniendo resultados considerables en cuanto a el numero de embriones recolectados y embriones transferibles ($7,79 \pm 8,15$ y $4,00 \pm 3,43$) para el promedio de embriones recolectados y de embriones transferibles por donante.

Tratamientos superovulatorio con FSH.

Seidel Jr. y Seidel (1991) establecen como esquema de la superovulación con FSH que consiste en la inyección de dicha hormona durante 4 o 5 días en un intervalo de 12 hr. Por cada inyección y en la dosis decreciente, ejemplo; 6,6: 5,5: 4,4; 2,2; 2,0 y 2,0 dando como 8 hasta 10 inyecciones de la FSH. La prostaglandina (PGF2 alfa) se suministra con la sexta o la séptima inyección de FSH obteniendo resultados considerables.

Varizanga, (1993) planteo un tratamiento superovulatorio con FSH en donde 30 donantes recibieron 34 mg de FSH en dosis decreciente durante cuatro días consecutivos, a razón de dos inyecciones diarias en un intervalo de doce horas entre una inyección y otra, las donantes recibieron una dosis de prostaglandina F2 alfa (PGF2 alfa) a las 48 horas después de la primera inyección de hormona estimulante de los folículos, el tratamiento se inicio entre los días 8 y 12 del ciclo estral, Obteniendo en un total de 22 donantes una buena respuesta superovulatoria con un numero de CL > 5, con un promedio de $(7,24 \pm 5,77)$ de embriones por donante, y $(4,56 \pm 5,25)$ de embriones transferibles lo cual indica que las donantes respondieron bien al tratamiento.

Este mismo investigador (Varizanga, 1993) realizo un tratamiento en 21 vaquillas holstein para analizar algunos factores como respuesta ovárica y calidad embrionaria, para lo cual el tratamiento superovulatorio se efectuó entre los días 8 y 12 del ciclo estral controlado, en el cual las 21 vaquillas recibieron una dosis entre 1,500 y 2,500 UI de gonadotropina corionica equina (eCG, intervet) por vía intramuscular, estas vaquillas recibieron una dosis de (500mg) de prostaglandina (PGF2 alfa; L clopóstenol ICI, Pharma) a las 48 y 72 horas después

de haber iniciado el tratamiento, encontrando los siguientes resultados: el promedio de embriones obtenidos por donante (4,3) la media de embriones fertilizados (3,10) y el promedio de embriones transferibles (2,86).

Díaz *et al.*,(1999) Realizaron un trabajo experimental en el cual 32 vacas de la raza holstein-friesian fueron sometidas a un tratamiento superovulatorio en el día doce del ciclo estral con FSH-p en una dosis total de 32mg dividida, en régimen decreciente, a lo largo de cuatro días con dos administraciones diarias (6x2; 5x2; 3x2; 2x2) todos los animales recibían al tercer día del tratamiento una dosis de 500mg de cloprostenol con el fin de inducir la lisis del cuerpo luteo, y observo los siguientes resultados: (10,50 ± 5,35) de cuerpos luteos, (7,25 ± 4,68) de embriones recolectados, (4,96 ± 3,73) de embriones transferibles.

Morales, (2001) realizaron una investigación con el fin de comparar la respuesta superovulatoria y algunos parámetros entre la gonadotropina corionica equina (eCG) administrada por vía aorta abdominal y preparado de FSH (pluset), los tratamientos superovulatorios se iniciaron entre el día 10 y 11 del ciclo estral (fase media luteal) de la siguiente manera, las vacas del grupo A fueron superovuladas con FSH-p (pluset, serono) por inyección intramuscular en dosis decreciente (1000 U.I de FSH y 1000 U.I de LH) durante cuatro días y los del grupo B se trato con 2000 U.I de eCG (folligon, itervet) por vía aorta abdominal. La lúteolisis se indujo con prostaglandina PGF2 alfa sintética, a las 60 horas de haber iniciado ambos esquemas de tratamiento. Morales observo los siguientes resultados: en la respuesta superovulatoria obtuvieron 70 y 75 % para FSH y eCG respectivamente, y que la media de embriones transferibles aunque es bajo, no hubo diferencia significativa para ambos tratamientos $P= 0.7296$ (3.50 ± 2.74 vs. 5.50 ± 3.42) para FSH y eCG respectivamente.

2.3.- Situación actual de la transferencia de embriones en el ganado bovino.

La transferencia de embriones es una técnica especializada que comprende la superovulación, la recolección de embriones de una hembra llamada "donante" y la transferencia propiamente dicha de los mismos a una o más hembras de la especie conocidas como "receptoras" (Jillella, 1982).

La primera transferencia de embriones realizada con éxito fue referida en 1891 por la universidad de Cambridge, en conejos.

En los bovinos el primer logro obtenido con esta tecnología se reporto en 1951, no haciéndose comercial hasta 1972 (Ramirez y Miller, 1995). Desde ese momento y hasta la fecha estos conocimientos han mantenido un aumento sostenido, sobre todo en Norteamérica, con un estimado de 140,000 transferencias anuales según Seidel, (1984), incrementándose a mas de 200,000 a finales de la década de los 80^a (Hasler *et al.*,1987).

La transferencia de embriones, al igual que otras tecnologías, aun cuando en las ultimas décadas sus conocimientos se han ampliado y acelerado, si tenemos en cuenta que la misma se viene aplicando en la producción animal desde hace más de 20 años, ha demostrado un lento desarrollo en los países en vías de desarrollo.

Es por esto que Sasson, (1984), en sus apuntes sobre "las biotecnologías": desafíos y promesas, publicados por la UNESCO, plantea que la actividad de los equipos de investigadores que efectúan sus trabajos en el campo de las biotécnicas se caracteriza por una competencia donde los imperativos comerciales y científicos están íntimamente ligados. Divididos entre el mundo académico y el mundo industrial y comercial, los investigadores se enfrentan con una situación conflictiva entre la necesidad de publicar rápidamente sus resultados en el primero de los mundos y la obligación de guardar secreto en el segundo.

Cualquiera que sean las razones por las cuales la transferencia de embriones no ha tenido un gran desarrollo en los países en vías de desarrollo, será necesario una mayor atención por instituciones educativas, profesionales y ganaderos, por las perspectivas que la misma presenta para la producción animal. En este sentido Seidel y Seidel (1991), realizaron un resumen de los objetivos potenciales de esta tecnología en los siguientes puntos:

- 1) Mejora la eficiencia de la producción.
- 2) Aumenta la disponibilidad de productos de origen animal a los consumidores.
- 3) Se obtienen ganancias por los servicios ofrecidos y por la venta de productos o de animales para pie de cría.
- 4) manipula la economía, tanto por la creación de nuevos empleos, o alterando el balance comercial entre varios sectores.
- 5) Simplemente ganar prestigio.

2.3.1.- Perspectivas de la transferencia de embriones según las nuevas biotecnologías.

Morrow (1986), hace un análisis muy exhaustivo de las aplicaciones, importancia y perspectivas de la transferencia de embriones en el ganado bovino y las agrupa en los siguientes puntos:

- Se aplica fundamentalmente para la mejora genética.
- Optimiza el tiempo en las pruebas genéticas de sementales.
- Se utiliza para la obtención de gemelos, fundamentalmente en el ganado de carne.
- Sirve para la comercialización interna y externa de animales a bajo costo.
- Es una herramienta importante para el estudio de la infertilidad.
- Se puede utilizar prospectivamente para controlar el sexo.

- A través de esta tecnología se pueden prevenir algunas enfermedades, sobre todo de origen viral.
- Cuando se aplica adecuadamente se acorta el intervalo intergeneracional.
- Constituye una vía importante para la investigación científica.

A pesar de que algunos de estos puntos son ya una realidad, aun quedan otros que necesitan más investigaciones para que sean aplicados de manera efectiva a nivel de campo y que constituyen un reto para los hombres de ciencia. Un ejemplo típico es la determinación y el control del sexo, aunque en estos momentos se esta comercializando el semen sexado, con algunas limitantes que superar (Amann, 1999).

Ya en estos momentos A.B. Technology (1996), comercializa un kit para la determinación rápida del sexo en embriones, utilizando la P.C R. (reacción en cadena con polimeraza), sin embargo, es un método costoso, por lo que no esta al alcance de los ganaderos con bajos ingresos.

Otro aspecto de la transferencia de embriones poco explotado en los países en vías de desarrollo, es su uso para el estudio de la infertilidad. Muchos de los conocimientos actuales que se tienen sobre la mortalidad embrionaria como causa de infertilidad en el ganado bovino se deben a esta tecnología. (Albihn *et al.*, 1991).

2.3.2. Estado actual del sexado del semen y su importancia en la transferencia de embriones.

Históricamente uno de los anhelos del hombre ha sido siempre la controlar el sexo de la descendencia, tanto en humanos como en animales domésticos (Hafes, 1989).

De este modo, surgieron varios métodos, desde los tildados de descabellados, hasta los estrictamente científicos para tal fin (Salisbury, *et al.*, 1978).

En medio de la explosión de conocimientos generados en las últimas décadas y específicamente en la cuestión reproductiva, una de las técnicas enmarcadas en biotecnología, es el sexado de embriones y espermatozoides (Notter, 1999), el control del sexo, ofrece varias perspectivas, tanto en especies domésticas como en exóticas o en peligro de extinción; por ejemplo en la industria lechera se prefiere el nacimiento en mayor proporción de hembras para el reemplazo (Abeydeera, *et al* 1998; y Kawarasaki, 1998).

El sexar la descendencia con la separación de los espermatozoides en fracciones de cromosomas X e Y de modo que la unión del ovocito con los primeros daría lugar a hembras Y, con los segundos, a machos. Algunas técnicas empleadas según Jonson y cols, (1997); Abeydeera y Cols, (1998) y Beyhan y Cols, (1999) son:

- a) Sedimentación de espermatozoides inmovilizados en algún medio.
- b) Centrifugación en gradientes de densidad.
- c) Citometría de flujo.

Los ensayos por conseguir este ideal, pueden dividirse en intentos para separar o inactivar de forma diferenciada los espermatozoides portadores de los cromosomas X e Y. los métodos de separación se han basado en presuntas diferencias entre los espermatozoides concernientes a forma, peso, carga eléctrica, motilidad (Hafez, 1989) y DNA (Jonson *et al.*, 1997).

La técnica actual más aceptada para separar espermatozoides, es la citometría de flujo, aplicada experimentalmente en varias especies de mamíferos, cuyo principio consiste en medir el DNA de los espermatozoides (Alvarez, *et al.*,

2000). Al menos en los bovinos, se tiene reportado que el cromosoma X tiene aproximadamente 4% más DNA que el cromosoma Y (Jonson, *et al.*, 1996), de ahí la lógica de separar cromosomas X e Y.

En 1989, Jonson y Cols. (citado por Beyhan *et al.*, 1999), reportaron el éxito del pronóstico de la tasa sexual en una población de conejos nacidos por inseminación artificial con semen separado por fracción de cromosomas X O Y, y que fueron sorteados por su contenido de DNA . Desde entonces el método se ha usado para predecir la descendencia en bovinos, cerdos, ovejas y humanos (Rath *et al.*, 1997; Seidel jr. *et al.*, 1997).

Dentro de los programas de transferencia de embriones, es deseable contar con información confiable sobre el genotipo del embrión, sobre todo sería importante en la comercialización, cuyo sexo asegurado sobrestimaría a los mismos. Esta posibilidad ofrece varias perspectivas tanto en especies domesticas como en exóticas o en peligro de extinción (Cortés *et al.*, 1999)

En la industria lechera, Ahlem y Fischer (1995), analizaron ñapa redituabilidad del sexado de embriones para este tipo de empresa; y señalaron un caso cuyo nacimiento de becerras producidas por rutina normal, fue tan baja, de alrededor de 32.9% por mes en donde superovular a las mejores vacas y posteriormente sexar los embriones, de algún modo amortiguo las perdidas al controlar a voluntad el sexo de la progenie, estos autores, creen además que este procedimiento sea una manera efectiva de obtener buenos reemplazos a partir de la mejores vacas.

La opción de conocer el sexo del embrión, resulta en un ahorro de gestaciones no deseadas al producir individuos cuyo sexo es de prioridad en cierta explotación, por lo que la comercialización de embriones con sexo predeterminado desde el momento de la inseminación artificial daría Un valor agregado a los mismos (Cortes, *et al.*, 2000).

III.CONCLUSIONES

Dentro de la transferencia de embriones encontramos que existen varios factores que pueden ser causa de variación al momento de realizar la superovulación, algunos autores han realizados estudios sobre la superovulación en ganado bovino, en los que han reportado que los factores más importantes son: El tipo de hormona utilizada, la dosis empleada y el momento del ciclo estral en que se inicia el tratamiento, otros autores indican que la vía de administración también influye marcadamente en la respuesta superovulatoria, como en el caso de la eCG aplicada por vía aorta abdominal.

Por otra parte la transferencia de embriones ha conseguido varios adelantos en cuanto a su aplicación y resultados, pero sigue ofreciendo un amplio campo para la investigación en sus diferentes áreas biotecnológicas como son la fertilización *in vitro*, el sexado de embriones y espermatozoides, la inducción de gemelos, un ejemplo es el sexado del semen que es de gran importancia en la transferencia de embriones por los grandes beneficios que se alcanzarían al obtener embriones con el sexo determinado desde el momento de realizar la inseminación artificial.

IV. LITERADURA CITADA

Abeydeera L.R., L.A. Jonson, Welch, W.H. Wang, A.C. Bloquest, T.C. Cantley, A. Rieke y B.N. Day (1998) Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 50(7):981-988.

Alvarez B.A., J. Arroyo, R. Cantón, C. Nombela y P.M. Sanchez (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology *clin. Microbiol. Rev.* 13(2):167-195.

A.B. Technology (1996). Bipartición, biopsia y sexaje de embriones bovinos. Manual de instrucciones. Tercera edición. A.B. Technology Inc. W.S.U. Research and Technology park U.S.A.

Ahmad, n.; Townsend, E. C.; Dailey, R. A and Inskeep, E. K. (1997) Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 49: 13-28.

Ahlem, W. y E. Fisher (1995) sexado de embriones. *Lechero latino* febrero/marzo 1995 pp. 14-17.

Albiñ, A, Gustafsson, H. And Rodriguez-martinez, H. (1991) Maternal influence on the early development of asynchronously transferred bovine embryo. *J. Reprod. Sci* 2A:25.35.

Alcala, L., De Armas, R., Solano, R., Garcia, J., y David, F. (1992): Efecto de la FSH-p y la PMSG sobre la respuesta superovulatoria en vacas holstein. IX jornada científica CIMA, noviembre. La Habana, p49

Alfurajji M.M. Alkinson, T., Broadben, P.J and Hutchinson, J.S.M. (1993) superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal anti-bodies. *Anim. Reprod. Sci.* 33:99-109.

Ali Dinar, M., Diskin, M.G., Donagh, T. And Sreenan, J.M. (1987): Oestrus and ovarian responses in repeatedly superovulated cows. *Theriog.* 27:201.

Amann, R.P. (1999). Issues affecting commercialization of sexed sperm. *Theriogenology* 52 1441-1457.

Armstrong, D.T. and Opousky, M.A. (1986): Biological characterization of pituitary FSH preparation with reduced LH activity. *Theriog.* 25:135.

Assey, R.H., Hyttel, p., Roche, J.F. and Boland M. (1994). Oocyte structure and follicular atteroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Mol. Reprod. Dev.* 39:8-16.

Augthry, J.D. 1987): Nutrition of donor and recipients cows. *Embryo transfer*,2:1.

Baird, D.T. (1972): Reproductive hormone. In hormone reproduction. E.d. by C.R. Austin and R.V. Sunt. University press. Cambridge. Pg.18

Barraza, A.S. (1997) Respuesta superovulatoria y calidad embrionaria en vacas Holstein tratadas con anti-PMSG en la fase tardía del pico preovulatorio de HL. Tesis, para la obtención de maestría en reproducción animal. Torreón Coahuila.

Berves, M.M y Dieleman, S.J. (1987) superovulation of cows with PMSG: variation in plasma concentration of progesterone, o estradiol, LH cortisol prolactin and PMSGand in a number of preovulatory follicle *Anim. Reprod. Sci.* 15:37-52.

Beyhan Z., L.A. Johnson y N.L. First (1999). Sexual dimorphism in IVM-IVF bovine embryos produced from X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 52(1):35-48.

Bergfelt, D.R., Bo, G.A., Maplketoft, R,J and Adams, G.P. (1997) Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at rondon stages of the oastrous cycle in cattle *Anim. Reprod. Sci.* 49:1-12.

Boland, M.P., Goulding, D. Y Roche, J. F. (1991) Alternative gonadotrophins for superolation in cattle. *Theriogenology.* 35: 5 17.

Bono, G. Gabai, G. Silverstrelli, L. and antonella Comin (1991): superovulatory and endocrinological responses of semental cows treated ei ther with PMSG or hMG or in combination. *Theriogenology.* 35:1179-1190.

Brendemuehl, L.P. Carson R.L. Wenzel, J.G.W.Boosinger, T.R. y Shelby, R.A. (1996) Effects of grazing endophyte-infected tall fescue on eCG and progestogen concentrations from gestation day 21 to 300 in the mare. *Theriogenology* 46: 85-96.

Brand, A., Trounson, A.O. Aartiz M.H., Drost, M. And Zaayer, d. (1978): superovulation and non surgical embryo recovery in the lactating dairy cow. *Anim. Prod.* 26:55-66

Butler, W.R., Everett, R.W. and Coppick, C.E.(1981).The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum holstein cows. *J. Anim. Sci.* 53:742-749

Bungartz, L. And H. Nieman (1994). Assesment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulacion by a single ultrasound examination. J. Reprod. Fert., 101:583-591.

Caeson, R.S., Fiudlay, J.K. and Burger, H.G. (1979): Receptor for gonadotropins in the ovine follicle during growth and atresia. In: channin, C.P., Maesh, J. And saler, A. (ed). Pg 89-94.

Caral, J.(1984):transplante de embriones. Articulo Rev. ACPA #2.

Caral, J., Solano, R., De Armas, R. y Alcalá, L. (1985): Superovulación en novillas holstein con gonadotropina serica y prostaglandina F2alfa. Rev. Cub. De reprod. Anim. 11:1.

Caral, J., Del sol, B.A., Solano, R., Holy, L. Y alcalá, L. (1988): Algunos factores que deben ser considerados al planificar métodos de superovulación en el ganado bovino. Rev. Cub. De Reprod. Anim. 14:69.

Chupin, D., Combarnous, Y. And Procureur, R. (1984): antagonistic effects of LH on FSH induced superovulation in cattle. Theriog. 21:229.

Cole, H., H. y Cupps, P.T. (1984). Reproducción de los animales domésticos. Editorial acribia. Zaragoza, españa. P. 420.

Cole H. Penchare, R. Y Goss, H., (1980): on the biological properties of highly purified gonadotropig from pregnat mares. J. Reprod. Fert. (suppl.) 23: 457-462.

Cole, H. Bigelow, M., Finkel, J. Y Rupp, G., (1967) Biological Ralf-life of endogenous PMSG following hysterec Tomy and studies on losses in orine and milk. Endocrinology 81:927-930.

Cortés, F.R., G.S. Romo y M.R.A. Alonso (1999) sexado de embriones en ganado bovino. Memorias del congreso de Buiatria 1999. Aguascalientes, Ags. Mex. Pp. 145-149.

Cortés, F.R., G.S. Romo y M.R.A. Alonso (2000). Sexado de embriones por las técnicas de micromanipulación y PCR. Memorias del congreso de Buiatria 2000, Guadalajara, Jal. Mex. pp. 253-256.

Cristser, J. K., Rowe, F.R., Del campo, M.R. and Ginther, O.J. (1980): Embryo transfer in cattle. Factors affecting soperovulatory response, number of transferable embryos and length of pots-treatment oestrus cycle. Theriog.13,6:397.

De Armas, R., Solano, R. y caral, J. (1985) Transferencia de embriones en bovino. Resúmenes VII Jornada interna. CIMA. La Habana, Cuba. P. 55

De Armas, R., del sol, B. A., Rommel, P. y Gonzales, F. (1987). Utilización de GnRH y anti-PMSG en la superovulación de vacas holstein. Resúmenes de la jornada científica ACPA, La Habana, Cuba, P. 18.

De Ruigh, I., R. E. Pearson and J. A.M. Van Wagtemdonsk-De Leeuw(1995) Are permanent donor cows. 11° Colloque scientifique. Association Europeenne de transfer embryonnaire, Hannover, 8 ed. Pp 158

Desaulniers, D. M., J. G. Lussier, A. K. Gofs, D. Bousquet and L. A. Guildault.(1995). Follicular development and reproductive endocrinology during and after superovulatorio in heifers and nature cows displaying constraining superovulatory responses. *Theriogenology*, 44:479-497.

Doff, H.M., Hay, M.F., Crau, D.G. and Moore, M.(1979): Effects of exogenous gonadotrophin (PMSG) on the antnatal Follicle-population in the sheep.*J. Reprod. Fert.* 56: 683-689.

Donaldson, L. E. And Ward, D.N. (1985): superovulation in cattle dose response to FSH with and without LH contamination. *Theriog.* 23:185.

Donaldson, L. E. And Ward, D.N. (1987): Effects on superovulation and fertilitation rates. *Theriog.* 27: 225.

Driancourt, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* vol. 55(6): 1211-1239.

Díaz, C., L.A. Quintela, A.I. Peña, J.J. becerra y P.G. Herradon.(1999). Influencia del día de inicio del tratamiento en los resultados de superovulación en vacas lecheras. *Arch. Zootec.* 48:43-50.

Eldsen, R.P., Nelson, L.D. Seidel, G. E. (1978) superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mares serum gonadotropin. *Theriogenology* . 9: 17-26.

Ellendorff, F., Tavarne, M., Elsaesser, F. And Parvirizi, M. (1974): endocrinology of parturition in the pig.

Elseden, R.P., Nelson, L.D. and Seidel, G.E. ,Jr. (1978) superovulating in the cow following tratament with PMSG and prostaglandin F2alfa. *J Reprod. Fert.* 36:455-456

Figueiredo, R.A., Barros, C.M., pinheiro, O.L. and Soler, J. M.P: (1997) Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 47: 1489-1504.

Foote, R.H. and Ellington, J.E. (1988) Is a superovulated oocyte normal. *Theriogenology* 29: 111-117.

Fortune, J.E., Sirois J. And Quirk, S.M. (1988) The growth differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29:95-109.

Fricke, P.M., J.D.kirsch, L.P.reinolds and D.A. Redmer.(1994) Studies of FSH induced follicular growth in cows. *Theriogenology*, 42: 43-53

García, S., A. Castrejon, M.F., De la Cruz, P., González, G. J., Murillo, L.S., Salido, R.G. (1995) *Fisiología Veterinaria, Sistema Endocrino, Adenoipofisis* p.692.

Gray, B.W., Carrtee, R.E., Stringfellow, D.A., Riddell, M.G., Riddell, K. P. And Wright, j.C.(1991) the effects dominant follicular regression and FSH priming on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology* 35:207.

Grasso, F., Guilbaut , L.A., Roy, G.L., Malton, P, and Lussier, J.G. (1989) the influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment or superovulatory responses in cattle. *Therogenology* 31:199.

Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. and Assey ,R. (1995) the effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43: 41-50

Guilbault, L.A., Grasso, F., Lussier, J.G., Rouither, P. And Matton, P. (1991) decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle.*J. Reprod. Fertil.* 91:81-89.

Gielen, J. Th., Roerink, G.H., Atoon, R. E., Noordigraaf, C.A. Vonk, Pasman, J., Hoeijmakers, M. J.H., Steeg, R.H.M., Coert, A., Auguer, D. And Nall, T. (1990) Use of PMSG plus neutra PMSG in diary cows treated repeatedly for superovulation. *Theriog.* 33, 1: 229.

Gordon, I. (1975): problems and prospets in cattle egg transfer. *Irish Vet. J.* 3:21-30

Gordon I., Boland, M.P., McGovern, H. and Lynn, G. (1987): Effect of season on superovulatory responses and embryo quality in holstein cattle in Saudi arabia. *Theriog.* 27: 231.

Goulding, D., Williams, D. H., Duffy, P., Boland, M.P. and Roche, J.F. (1990): superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriog.* 34: 667.

Goulding, D., Williams, D. H., Boland, M.P. and Roche, J.F.(1991) superovulation in heifers using either PMSG or FSH during the mid luteal stage of the estrous cycle. *Theriog.* 36:949-958

Greeve, T., Callensen, H. and Hotted, P. (1984) Characterization of plasma LH profiles in superovulated dairy cows. *Theriog.* 21:237.

Ginther, O.J., J.P. Kastelic and L.knopf (1989) composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. reprod. Sci.*, 20: 187-200

Hafez, E.S.E.(1989) endocrinología de la reproducción. En Reproducción e inseminación Artificial en animales 5ta ed. Nueva editorial interamericana, S.A Mexico.

Hasler, J. f. McCaley, A.D., Shermerhorn, E.C. and Foote, R.H. (1983): Superovulatory responses of holstein cows. *Theriog.* 19:83-99.

Hasler, J.F., McCauley, A.D., Lathrop, W.P. and Foote, R.H. (1987). Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large – acale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27 (1): 139-168.

Hill, J.R., Church, R.B. and Shea, B.F. (1970): Effect of under nutrition on Ovarian Function and fertility in beef heifers. *Biol. Reprod.* 2:78-84.

Hill, kJ. MacFarland, R.W, Rosie S.D.,Viker, R. And Godke, A. (1985): A single 50mg inection and of FSH for superovulation of embryo donor cattle. *Theriog.* 23:196.

Hirshfield A. N. And Midgley, A. R. (1978): the role of FSH in the selection of large ovarian follicle in the rat. *Biol. Reprod.* 19:606.

Holy, L., Jiricek, A., Zak, M. And Maxian A.(1987):Superovulace a vyplach delohy ve vztahy kmasledene koncepci krau darkynb. *Verinarni medicina* 32:321.

Huhtinen, m., Raino, V., Aalto, J., bredbacka, P and Maki-Tanila, A. (1992). Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology* 37: 457-463.

Ireland, J.J. and Roche, J.F.(1987) Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. Roche and O'Callaghan (eds) *Follicular Growth and Ovulation rate in farm animals* nijhoff publishers, 1-18

Iglesias, C. (1978): Obtención y transplante de embriones en el ganado bovino. Tesis para la opción por el grado de candidato a doctor en ciencias. CIMA, LA HABANA.

Jainudeen, R.M., Hafez, S.E. and Lineweaver, R. (1966) .Superovulacion in the calf. *J. Reprod. Fert.* 12:149.

- Jillella, D. (1982) El trasplante de embriones en el ganado bovino. Folleto de zootecnia N° 1 julio. 1ra, edición. Departamento de zootecnia. Universidad Autónoma de Chapingo. Mexico.
- Johnson L.A., c.H. Allen, G.R. Welch y W. Rens (1997). Comparative flow cytometry sorting efficiency of X-and Y-chromosome bearing sperm from 40 bulls. *Theriogenology* 47(1):269-278.
- Kawarasaky T., G.R. Welch, Long, M. Yoshida y L.A. Johnson (1998). Verification of flow cytometrically-sorted X-and Y-bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. *Theriogenology* 50(4):625-635.
- Kasper, K. C., Fashandi, S., Le T. Y Marr, G. (1987): Dipstick test for (PMSG) and oestrus (LH) in Mares. *J. Reprod. Fert. (suppl.)* 35: 717-718.
- Kindahl, H. Knudsen, O., Madej, A. y Edqvist, L.E. (1982) Progesterone, prostaglandin F-2alpha PMSG and oestrus sulphate during early pregnancy in the mare *J. Reprod. Fert. (suppl.)* 35:717-718.
- Ko J.C. H. Kastelic, J., Del campo, M:R and Ginther, O.J. (1991) effect of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 91:511.519.
- Lamond, D.R. (1970) The effect of PMSG on ovarian function of heifers, as influenced by progestins, plan of nutrition and fasting. *Aust. J. Agric. Res.* 21:153-161.
- Lerner, s.P., Thayne, W.V., Baker, R.D, Henchen, T. Meredith, L., Inskoop, E.K., Dailey, R.A., Lewis, P.E. and Butcher, R.L: (1986): Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63:176-183.
- Leyva, O.C., Barreras, S.A. y Varizanga, M.D. (1999) manual de transferencia de embriones no quirúrgica en ganado bovino (impreso en U.A.B.C. Mexicali, B.C., Mexico) P. 65-74, 79-84.
- Liao, T. y Pierce, J., (1970) The presence of a common type of subunit in bovine thyroid-stimulating and luteinizing hormones. *J. Biol. Chem.* 245:3275-3281.
- Lindsell, C.E., Murphy, R.D. and Maplettoft, R.J. (1986) Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FASH-p at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26:209-219.
- Loayza P.W. (1999). Dinámica del crecimiento folicular en vacas no lactantes del genotipo Siboney de Cuba (5/8Hx3/8C). tesis MSC. CIMA.C. Habana. pp. 51-56.

Lucy, M-C. Savio, J.D., Bandinga, I., De la sota, R.L. and thatcher W.W. (1992) factors affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70:3615-3626.

Madan, M.L. (1990): Factors limiting superovulation responses in embryo transfer program among buffaloes *theriog.* 33,1:280.

Mariana, J.C., Mauleon, P., Benoit, M. Et Chupin, D. (1970) Variablite et repetabilite du nombre d' ovulations obteme apres injection de 1600 UI de PMSG et 1500 Ui de hCG *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophy.* 10, 1:31-46

Mariam, D.H. (1993) efecto de la dosis de FSH en el tratamiento superovulatorio en el genotipo Siboney. Tesis de opción a maestria en reproducción animal. La Habana, Cuba. p. 18-22,46-49.

Mapletouft, R., Jonson; W. And Adams, M. (1987): Effects of rogestagen implant on superovulatory response in the cow. *Theriogenology.* 13:1-102.

Mapletouft, R.J., Pawlyshyn, V., Garcia, A., Bo, G.A, Willmolt, N. Sounders, J. And Schmutz, S. (1990): Comparrison of four different gonadotropin treatements for inducing superovulation. *Therlog.* 33:282.

Massey, J.M. and Oden, A. J. (1984): Non seasonal effect on embrio donor performance in the south west region of the USA. *Therlog.* 21: 196.

Mattehaei, K.I., Herr, C.M., Bradley, M.P. and Reed, K.C. (1990) Analysis of the sex chromosome constitution of single bovine spermatozoa by polymerase chain reaction (PCR). *Theriogenology.* 33:285

Matthews, M.E., mattehaei, K.I., Herr, C. And Reed k.C. (1987): Sex determination of pre-implantation livestock embryos. *Proc. Asust. Soc. Reprod. Biol.* 19:40.

Mauleon, P. (1974): Nassances gemellaires ches less bovins bull. *Tech. Du CRUZ* (# especial),83.

Miguet, P.(1983): Billan de panalyse de la base de donneás constituí par le fichier nacional des douneuses et des receveuses, Jouy-en-Jousas:INRA.

Monniaux, D., Chupin, D, and Saumande, (1983): Superovulation response of cattle. *Therlog.* 19,1 :55-81.

Moore, N.W. (1975): The control of teme of Oestrus and ovulation and the induction of superovulation in cattle. *J. Agric. Res.* 26.295-304

Morrow, A.D. (1986) *Current therapy in Theriogenology.* Secon edition. Saunders company. U.S.A.

Morales, C. J. L. (2001) Resultados comparativos entre un preparado de FSH-p (pluset) y la eCG administrada por vía aorta abdominal en un programa de T.E. en vacas lecheras de la comarca lagunera. Tesis para obtener el título de M.V.Z. Terreon Coah. Mex. 2001.

Nett, T. M., Holtan, D.W. y Estergreen, U.L. (1975). Oestrogens, LH, PMSG and prolactin in serum of pregnant mares. J. Reprod. Fert. (Suppl.) 23:457-462.

Newcomb, R., Christie, W.B. and Rowson, L.E. (1978): Non-surgical recovery of bovine embryos. Vet. Rec. 102: 414-417.

Notter, D.R. (1999). The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. J. Anim. Sci. 77:61-69.

Papkoff, H. (1981) Variations in the properties of equine chorionic gonadotropin. Theriogenology. 15:1-11.

Peters, A.R. Riley, G. Rhodes, J. And Lamming, G.E. (1980). Milk progesterone profiles and oestrus activity in post-partum beef cows. A.R. Peters *et al* . in 9th Inter. Cong. On Anim. Reprod. And A.I. Madrid, 16-20 Jun.

Ramirez, G.J.A y Miller, G.B. (1995): Adelantos biotecnológicos en reproducción animal aplicados a bovinos de carne. Teseachic. Revista para el ganadero N°8 Febrero. Facultad de zootecnia. U.A.Ch. Mexico

Rath D., L.A. Johnson, J.R. Dobrinsky, G.R. Welch y H. Niemann (1997). Production of piglets preselected for sex following *in vitro* fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. Theriogenology. 47(4).795-800.

Roser, J. Y Lofstedt, R.M., (1989). Urinary eCG patterns in the mare during pregnancy. Theriogenology 32:607-622.

Roche, J.F. and Boland, M.P. (1991): Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive stages. Theriogenology. 21:117.125.

Rouilleir, P., Matton, P. Guilbault, L., Grasso, F. And Lussier, H. (1990). Influence of dominant follicle atresia and estradiol release by ovarian follicle during superovulation in cattle. Theriogenology 33: 3/3.

Rodriguez J.L. and Gregory, R.M. (1986) Superovulation response in cows following administration of FSH-p. And prostaglandin. Theriog. 25:190.

Saiki, R.K. Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, h.A. and Arnheim, N.b. (1985) Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230:1350-1354.

- Salisbury, G.W., N.L. Van Demark y J.R. Lodge (1978). Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovidos. Acribia. Zaragoza, España pp. 122-125.
- Sasson, A. (1984) Las biotecnologías: Desafíos y promesas. UNESCO. Centro de investigaciones Biológicas. La Habana, Cuba.
- Saumande, J., Proucureur, R, and Chupin D. (1984): Effect of injection time of anti-PMSG anti serum on ovulation and quality of embryo in superovulated cows. Theriogenology. 21:727.
- Saumande; J. And Chupin, D. (1986): induction of superovulation in cyclic heifers. The inhibitory effect of large doses of PMSG. Theriogenology. 25:233.
- Saumande, J. (1995) La Production d'embryons chez les bovins: Quelles voies de recherches pour améliorer l'efficacité des traitements des superovulations. INRA Production animales, 8:275-283.
- Seidel Jr. G.E., C.H. Allen, M.D. Holladay, Z. Brink, Welch, J.K. Graham y M.B. Cattell (1997). Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. Theriogenology 45(19309-315).
- Seidel, S.M. (1984) Survey of embryo transfer industry. Embryo transfer newselett. 3:8-10.
- Seidel, G.E. Jr. And Seidel, S.M. (1991): training manual for embryo transfer in cattle. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Shea, D.F. Hines, Lightfoot, D.E., Ollis, E.W. and Olson, S. (1976): The transfer of bovine embryo. In egg transfer in cattle. Ed. Rowson, L.E.A., CEC. Luxembourg. pg 145-152
- Sugano, M. And Shinogi T. (1999) Superovulation induction in Japanese black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. Animal reproduction science, Vol. 55 (3-4) 175-181.
- Staigmiller, R.B., R.A. Bellows, G.B. Anderson, G.E. Jr. Seidel, W.D. Foote, A.R. Menino and R.W. Jr. Wright. (1992) Superovulation of cattle with equine pituitary extract and FSH-p. Theriogenology 37:1091-1099.
- Taylor, C. And Rajamahendran, R. (1991) Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. J. Anim. Sci. 71:61-68.
- Thimonier, (1978): L'activité ovarienne chez les bovins, Moyens d'étude et facteur de variation Ann. Med. Vet. 122:81.
- Tucker, H.A. (1982): Seasonality in cattle. Theriogenology. 17:53-59

Ungerfeld, R., Ibarra, D, y Rubianes, E. (1995) Use of anti-eCG improves ovarian response in ewes eCG. *Theriobology* 43:342.

Ungerfeld, R (1998) Gonadotrofina corionica equina: caracterización y utilización. Recopilación Bibliografica. Uppsala and Montevideo.p.19

Utsumi, k., Kobayashi, S and Yamada, M, (1997) Efficacy of passive immunization on growth of follicles and subsequent superovulatory response in Japanese black cattle. *Theriogenology*. 27:407-419.

Varizanga, D.M. (1993) transferencia de embriones en el ganado bovino. Algunos factores que influyen en la respuesta superovulatoria de la donante y la gestación en receptora. Tesis para la opción de maestría en reproducción animal, La Habana, Cuba. P. 104:237-241.

Warfiel, S.J. Seidel, G. E. and Elsdon, R.P. (1986): A comparison of two FSH regimens for superovulating cows and heifers. *Theriog.* 25:291.

Wilson, J.M., Jones, A.L. and Miller, D.R. (1990). Influence of a dominant follicle on the superovulatory response. *Theriogenology* 33:349.

Yamauchi, S., (1975) Morphology and histochemistry of the endometrial cup. *J. Fert. (suppl.)* 23:397-400