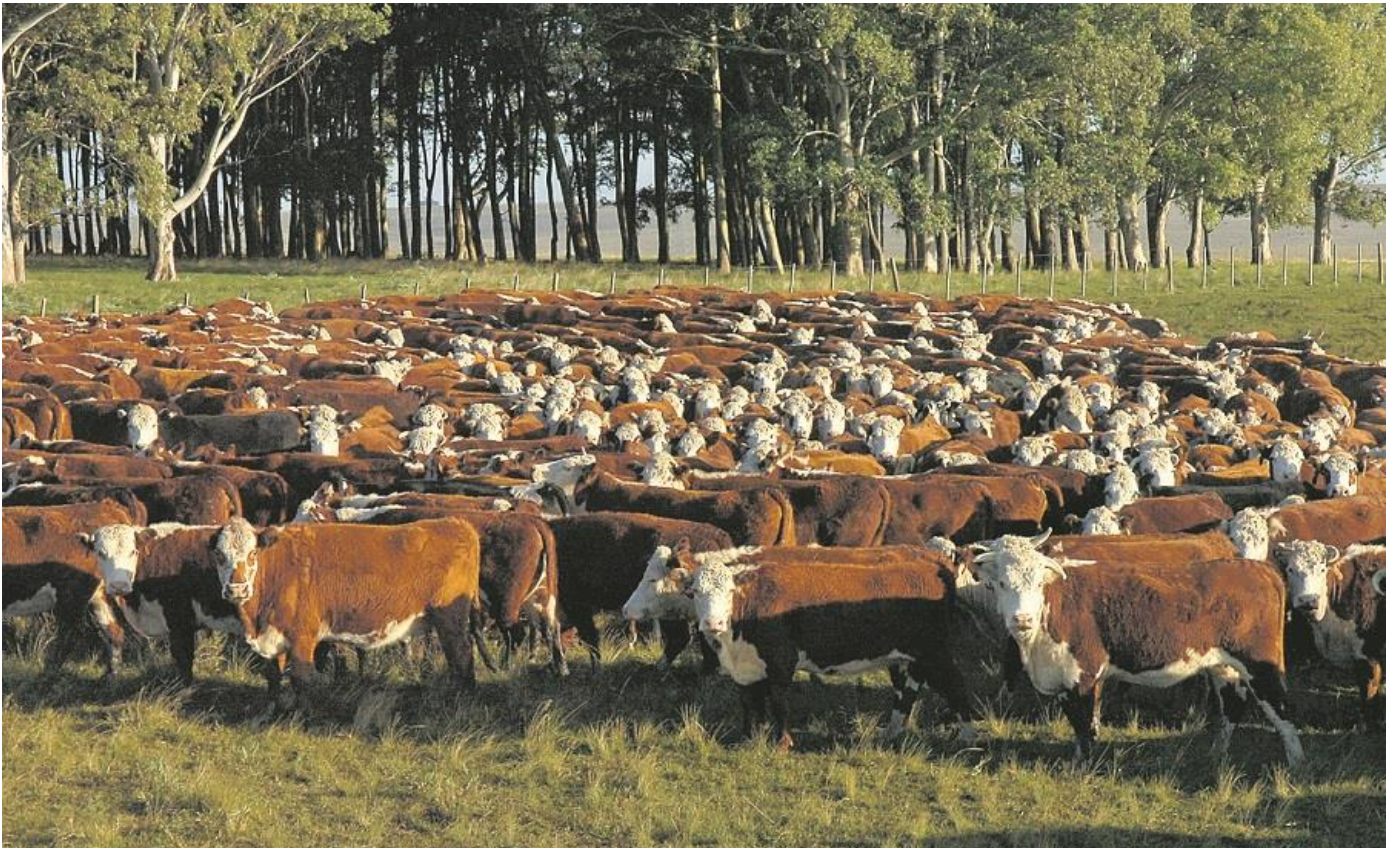




FACULTAD DE AGRONOMÍA
Y VETERINARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL
DE RÍO CUARTO

PROCOLOS DE SINCRONIZACIÓN Y SUPEROVULACION PARA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

Ana Zavattieri Potes



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar al grado de Médico Veterinario

Modalidad: Monografía

**Protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de
embriones en bovinos**

Nombre del alumno: Ana Zavattieri Potes

DNI: 94892316

Director: Maria Belén Rabaglino, PhD

RÍO CUARTO-CORDOBA

08/2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: **PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN Y SUPEROVULACIÓN PARA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS**

Autor: Ana Zavattieri Potes

DNI: 94892316

Director: Dra. Maria Belén Rabaglino

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Dra. Maria Belén Rabaglino

Dr. Fernando García

Dra. Laura Macor

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

Modalidad: Monografía

RESUMEN

La transferencia embrionaria (TE) es la técnica más utilizada en el mundo para reproducir hembras de alto valor genético y en la actualidad es aplicada a casi todas las especies de animales domésticos, algunas especies de animales salvajes y exóticos, e inclusive a la especie humana. Las mejorías en la eficiencia reproductiva y la multiplicación de genotipos más productivos están directamente ligadas a incrementos en la productividad, los cuales son factores decisivos para la sustentabilidad de la actividad pecuaria. Por esta razón, las investigaciones proponen la TE como una de las herramientas biotecnológicas básicas para aumentar la cantidad y calidad de los bovinos producidos. En condiciones normales, cada vaca produce una sola cría al año, lo cual significa que, cuanto mucho producirá de 6 a 12 terneros en su vida. Con la transferencia de embriones, se ha llegado a obtener más de cien crías de una vaca durante su vida productiva. La transferencia de embriones está dentro de un marco de mejoramiento genético y se puede hacer tanto en fresco como también en forma congelada. El trabajo consiste en superovular vacas élite de alta producción, para poder multiplicar esa genética. La superovulación de la vaca permite que ésta, en vez de ovular una sola vez y producir un embrión por año, con la estimulación, produzca mayor cantidad de óvulos, que pueden así, llegar a 10 o 12. Posteriormente, se insemina a las vacas, y 7 a 8 días después, los profesionales encargados del protocolo de trabajo se encargan de realizar la colecta de embriones. Existen muchas razones por las cuales un productor puede optar por la transferencia de embriones. La primera razón puede ser la probabilidad del mejoramiento genético del rodeo. Por medio de la inseminación artificial (IA), la genética superior de los machos se puede propagar en un rodeo; mientras que, con la transferencia de embriones, la genética superior de las hembras puede tener el mismo efecto en una o en muchas manadas. La transferencia de embriones permite que una hembra en particular produzca muchas crías en un año determinado y muchas más en su periodo reproductivo. Cada una de estas crías tiene la gran posibilidad de llevar los rasgos superiores de la madre, tales como la capacidad de aumentar de peso y tamaño, o incluso de producir más leche. Otros beneficios de la TE son el control de las enfermedades, la protección de las funciones reproductivas y el aumento de las posibilidades de que nazcan mellizos. Entre las aplicaciones de la TE, podemos nombrar, congelación de embriones, uso intensivo de la hembra de alto valor genético, recuperación más eficaz de individuos exóticos y de razas en peligro de extinción, importación y exportación de material genético, introducir rápidamente una raza no existente en un país, transportar hatos enteros en forma de embriones congelados, con un costo inferior al costo de transporte de un solo animal adulto.

INDICE

Índice de abreviaturas	1
Índice de figuras	2
Introducción	3
Objetivos	4
DESARROLLO	5
1. Fisiología Reproductiva Bovina	5
1.1 Control neuroendocrino del ciclo estral bovino	5
1.2 Fases del Ciclo Estral	7
1.3 Dinámica Folicular Ovárica	9
2. Superovulación en Bovinos	12
2.1 Objetivos de la técnica de superovulación	12
2.2 Factores que afectan la superovulación en bovinos	13
2.3 Selección de hembras donantes	16
2.4 Selección de hembras receptoras	18
2.5 Superovulación de la hembra donante	20
2.5.1 Sincronización del inicio de la onda folicular	22
2.5.1.1 Estrógenos y progestágenos	22
2.5.1.2 Ablación folicular	28
2.5.1.3 GnRH o pLH	30
2.5.2. Inducción de la superovulación	32
2.5.2.1. Gonadotropinas	32
2.5.2.2 FSH + eCG: Uso de eCG en las etapas finales del tratamiento superestimulador	35
2.5.2.3 Superovulación con una sola inyección de FSH subcutánea	37
2.5.2.4 Superovulación utilizando una única administración de FSH en una fórmula de liberación lenta	39
2.5.2.5 Superovulación con dos inyecciones intramusculares de FSH en concentraciones reducidas de hialuronato	40
2.5.2.6 Estimulación de los folículos subordinados	41
2.5.2.7 Superovulación de la primera onda folicular	42
2.5.2.8 Superovulaciones repetidas	43
2.5.3 Sincronización de la ovulación	45
2.5.3.1 GnRH o pLH	45

2.5.3.2. Deslorelina	45
2.5.4 Nuevas tecnología	46
CONCLUSION	48
BIBLIOGRAFÍA	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AM Antes del mediodía
BE Benzoato de estradiol
Bid dos veces por día
CIDR-B Dispositivo de aplicación intravaginal a base de progesterona
CL Cuerpo lúteo
DVB Virus de la diarrea viral bovina
E-17 β Estradiol 17 β
EB Benzoato de estradiol
eCG Gonadotropina coriónica equina
ECP Cipionato de estradiol
EPE Extracto de pituitaria equina
EV Valerato de estradiol
FD Folículo dominante
FSH Hormona folículo estimulante
GnRH Hormona liberadora de gonadotropinas
hCG Gonadotropina coriónica humana
IA Inseminación artificial
IATF Inseminación artificial a tiempo fijo
IU o UI Unidad internacional
LH Hormona luteinizante
MAP-5 Sal del ácido hialurónico
mg Miligramo
ml Mililitro
mm Milímetros
ng Nanogramos
P4 Progesterona
PGF2 α Prostaglandina F2 alfa
PGI2 Prostaciclina
pLH Hormona porcina luteinizante
PM Después del mediodía
PMSG Hormona gonadotropina suero de yegua preñada
PVP Polivinilpirrolidona
SC Sub-cutáneos
SMB Implante subcutáneo de progestágeno
SOV Superovulación; o respuesta superovulatoria
TE Trasplante de embriones

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Control neuroendocrino del ciclo estral bovino.	6
Fig 2. Niveles de hormonas durante el ciclo estral de la vaca.	8
Fig 3. Dinámica folicular bovina.	11
Fig 4. Esquema de un protocolo de inducción de superovulación con estradiol y progesterona	24
Fig 5. Protocolo P-36	25
Fig 6. Protocolo P-24	26
Fig 7. Esquema de un protocolo de superovulación después de tratamiento con estradiol y progesterona y uso de IATF	27
Fig 8. Esquema de un protocolo de superestimulación luego de ablación folicular	29
Fig 9. Esquema de un protocolo de superovulación después de sincronizar la emergencia de la onda folicular con GnRH ó pLH.	31
Fig 10. Sincronización de la emergencia de la onda folicular con GnRH	31
Fig 11. Esquema de dos protocolos con utilización de la FSH con CL del ciclo y CL más dispositivo intravaginal con P4.	35
Fig 12. Esquema de un protocolo de superovulación reemplazando las dos últimas inyecciones de FSH con dos inyecciones de 200 UI de eCG seguidas de IATF	36
Fig 13. Esquema de un protocolo de superovulación con una sola inyección de FSH	38
Fig 14. Esquema de un protocolo de superovulación en dosis divididas de FSH en 10 mg/ml o 5mg/ml de hialuronato, seguida de la sincronización de la emergencia de la onda folicular y el uso de IATF.	41
Fig 15. Esquema de un protocolo de superestimulación de los folículos subordinados	42
Fig 16. Esquema de un protocolo de superovulación en la primera onda folicular	43
Fig 17. Esquema de un protocolo de superovulaciones repetidas sin sincronización de la emergencia de la onda folicular	44

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones en el ganado bovino es una biotecnología cuya aplicación ha ido en constante aumento en los últimos años, debido a que permite acelerar la ganancia genética y mejorar la eficiencia productiva de un rodeo.

La superovulación es el factor que más limita a la técnica de transferencia de embriones y su contribución a la mejora genética animal. Se sabe que la superovulación continúa siendo un método muy ineficiente de obtención de ovocitos de ovarios bovinos y es probable que dentro de una década sea substituido por otros enfoques con mayor éxito. Sin embargo, aun así, la superovulación resulta en un porcentaje diez veces mayor de embriones que la recuperación del óvulo único producido por una hembra no sometida a estos tratamientos. Según el protocolo usado y otros factores que se discuten en este trabajo, se pueden obtener entre 5 a 12 embriones de un tercio de las donantes superovuladas. En un pequeño porcentaje de las donantes puede esperarse la producción de 20 embriones de buena calidad y 50 muy raramente para algunas donantes. Aun así, de momento la técnica de superovulación y sus diferentes protocolos para lograrla aún se justifican plenamente.

La mayoría de los trabajos de investigación sobre protocolos de superovulación estudian sólo un protocolo o comparan una técnica específica con otra anteriormente usada. En este trabajo se pretende de una forma organizada, y no demasiado extensa, presentar la mayoría de los protocolos, que han sido establecidos y testados con éxito en los últimos años, tendientes, por un lado, a sustituir y simplificar los protocolos anteriormente usados con tasas de éxito menores, ultrapasando las limitaciones que presentaban y de aumentar el número de embriones obtenidos por tratamiento, mediante el control de la dinámica folicular ovárica.

Con este trabajo, alguien interesado puede en poco espacio de tiempo, ponerse al corriente de los diversos protocolos, su eficiencia, dónde y cómo se han usado, y hacer una selección conveniente para ser aplicado, o, a partir de uno ya existente proponer alguna variante del protocolo.

En el desarrollo de la monografía se presenta una breve descripción del ciclo estral, de la dinámica folicular y de los factores a tener en cuenta al momento de elegir tanto las hembras donantes como las receptoras.

Objetivos

A. Objetivo general:

Desarrollar brevemente y sintetizar los diferentes protocolos de sincronización y superovulación para la transferencia de embriones en ganado bovino

B. Objetivos específicos:

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre las bases fisiológicas del ciclo estral bovino, los conceptos generales de sincronización y superovulación para la transferencia de embriones en bovinos.
2. Sintetizar y analizar los protocolos disponibles en relación con su eficacia y aplicabilidad
3. Elaborar para cada protocolo un diagrama que muestre en forma resumida toda información relevante.

DESARROLLO

1. Fisiología Reproductiva del Bovino

Una de las funciones principales de todas las especies es la reproducción, lo que permite la perpetuidad de las mismas. Para lograr esta función, las especies domesticas deben cumplir con ciertos requisitos. Esto significa en términos fisiológicos, lograr un desarrollo y peso corporal determinados, cierta edad y reservas energéticas como para llevar adelante con éxito una gestación y tener la capacidad de alimentar a sus crías (Mayer et al., 2004).

Cuando la hembra alcanza la pubertad manifiesta cambios rítmicos en su conducta sexual (receptividad sexual), en donde entra a un periodo de ciclicidad reproductiva que continua a través de toda su vida, a excepción del periodo de gestación o de balance energético negativo en el cual prevalece el anestro (Sartori y Barros, 2011). Los acontecimientos que comienzan en un celo y finalizan en el siguiente reciben el nombre de ciclo estral, el cual se caracteriza por el crecimiento y la regresión de folículos y cuerpo lúteo, en un promedio de 21 días (rango 17- 25) y se produce en forma continua a lo largo del año, por lo que se clasifica a las hembras bovinas como poliéstricas continuas. El conocimiento de los mecanismos involucrados en el control del ciclo estral (de la ovulación, de la función lútea, de la dinámica folicular, etc.) dan las bases para comprender y establecer métodos eficientes de sincronización del celo, como así también tratamientos que aumenten el número fisiológico de ovulaciones (superovulación), (Palma, 2001).

1.1 Control neuroendócrino del ciclo estral

El control endógeno del ciclo estral del bovino implica la secreción interrelacionada de varias hormonas (figura 1) que incluyen la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo, la hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH) secretadas por la glándula pituitaria (hipófisis), estrógenos, progesterona e inhibina secretados por los ovarios y prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) secretada por el útero. La FSH es la responsable del proceso de esteroidogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular. La LH también interviene en el proceso de esteroidogénesis ovárica, ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Estas hormonas son secretadas a la circulación en forma de pulsos y son regulados por dos sistemas, el tónico y el cíclico. El sistema tónico produce el nivel basal circulante, siempre presente, de

hormonas hipofisarias las cuales promueven el desarrollo de los elementos germinales y endocrinos de las gónadas, el sistema cíclico opera más agudamente, siendo evidente por sólo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de la hembra. El modo cíclico tiene por función primaria causar la ovulación. La neurohipófisis también almacena la oxitocina producida en el hipotálamo.

Entre las hormonas que producen los ovarios, los estrógenos, hormonas esteroideas, son producidos por el folículo ovárico y tiene acciones sobre los distintos órganos blanco como son los oviductos, el útero, la vagina, la vulva y el sistema nervioso central, en el cuál estimulan la conducta de celo y ejercen un *feed back* negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico. La progesterona, hormona esteroidea, es producida por el cuerpo lúteo por acción de la LH. Los efectos de la progesterona se observan después que el tejido blanco ha estado expuesto durante cierto tiempo a la estimulación de los estrógenos. Esta preparación por los estrógenos conduce a un efecto sinérgico. La progesterona prepara el útero para el implante del embrión y para mantener la gestación. A nivel hipotalámico ejerce un efecto negativo sobre el centro tónico. La inhibina, hormona proteica, es producida por el folículo ovárico (células granulosas) e interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH y ejerce un *feed back* negativo a nivel hipofisario, produciendo una menor secreción de FSH. El útero produce la $PGF_{2\alpha}$ la cuál interviene en la regulación endócrina del ciclo estral mediante su efecto luteolítico. Otras funciones de las prostaglandinas son la de intervenir en los mecanismos de ovulación y de parto (Beculaba, 2007).

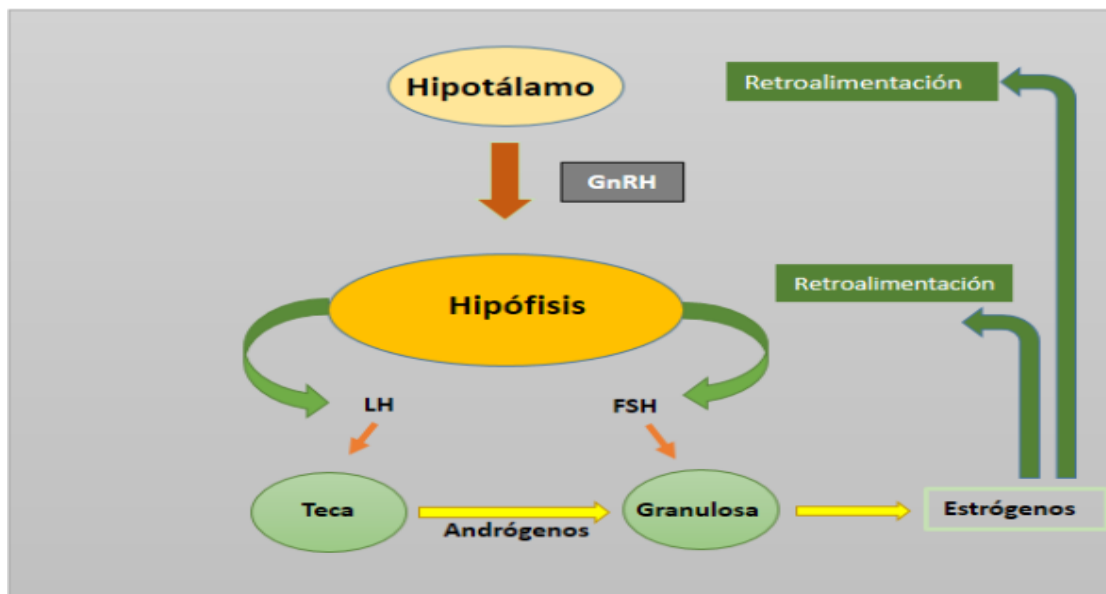


Figura 1. Control neuroendocrino del ciclo estral bovino. Adaptado de Bahamonde, 2010

1.2 Fases del ciclo estral bovino

El ciclo estral se caracteriza por tener tres fases, las cuales dependen de la actividad del ovario. La primera es la fase folicular o proestro. En esta fase sucede el crecimiento de los folículos que liberan los estrógenos responsables de la conducta del celo. La segunda fase, llamada fase periovulatoria o metaestro, comienza cuando inicia el celo. Durante esta fase se libera el pico mayor de gonadotropinas (LH) que provocan la ovulación. La tercera fase se llama fase luteal o diestro. Después de la ovulación, en el lugar donde antes estuvo el folículo, queda una fosa. Allí los restos del folículo sufren cambios importantes por influencia de la LH y se forma el cuerpo lúteo (CL), (Iñiguez, 2011).

La fase folicular o de regresión lútea (proestro) cuya duración es de 3 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación de celo. Al producirse la destrucción del cuerpo lúteo tenemos una caída en los niveles de progesterona y posteriormente una pérdida de tejido luteal, siendo la $PGF_{2\alpha}$ de origen uterino el principal agente luteolítico en los animales domésticos. Como consecuencia de la caída de los niveles de progesterona, disminuye el *feed back* negativo que dicha hormona tenía a nivel hipotalámico y comienza a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotróficas (FSH y LH) y se estimula el crecimiento folicular con el desarrollo de un gran folículo y el aumento en los niveles de estradiol. Cuando los estrógenos alcanzan cierto nivel, se estimula la receptividad al macho y comienza el periodo de celo o estro (Figura 2).

La fase pre-ovulatoria (estro-metaestro) comienza con la receptividad al macho (la vaca se deja montar por otras vacas y toros), e involucra todos los cambios que permiten la ovulación y el comienzo de la formación del cuerpo lúteo. Durante el estro, cuya duración es de aproximadamente 18 h, la vaca manifiesta inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y pierde el apetito; en el caso de las vacas lecheras, se reduce la producción de leche. Las vacas presentan descarga de mucus con mínima viscosidad, cuyo olor atrae y excita al toro (presencia de feromonas), edema de vulva y en el útero se produce un aumento del tono miometrial, detectado fácilmente por palpación transrectal. Durante esta fase, los estrógenos en altas concentraciones alcanzan un umbral de estimulación del centro cíclico hipotalámico, estimulando a las neuronas hipotalámicas a producir el pico de GnRH y en consecuencia el pico de LH. Con respecto a la FSH, disminuye su secreción, consecuencia del *feed back* negativo estrogénico y de la inhibina, con excepción del momento en que se produce el pico preovulatorio de LH, en que puede aparecer un pico de FSH. Posteriormente, 4 a 12 h después de la onda de LH, se incrementa la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH,

relacionándose esto con la primera onda de crecimiento folicular. Luego de 12 a 24 h de comenzado el celo, el sistema nervioso de la vaca se torna refractario al estradiol y cesan todas las manifestaciones psíquicas del mismo. El periodo inmediato a la finalización del celo, es el metaestro (6 días). En este periodo ocurre la ovulación de la vaca, a diferencia de otras especies que lo hacen durante el celo, y comienzan la organización celular y desarrollo del cuerpo lúteo. La ovulación ocurre 28 a 32 horas de iniciado el celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH. Después de la ovulación hay una hemorragia profunda y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en cuerpo hemorrágico. En la formación del cuerpo lúteo (luteinización) se producen una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que permiten que las células foliculares se transformen en células luteales, cambios que finalizan al séptimo día con un cuerpo lúteo funcional. La última etapa, fase luteal (diestro) se caracteriza por el dominio del cuerpo lúteo. El CL produce progesterona a partir del cuarto o quinto día después del celo. El mantenimiento del CL, así como la síntesis de progesterona está ligada a la hormona LH que es progesterotrófica y luteotrófica. Otras hormonas que intervienen en la síntesis de progesterona, son la FSH y la prostaciclina (PGI₂). La progesterona inhibe la producción de GnRH en el hipotálamo y reduce la liberación de LH en la hipófisis, lo cual evita nuevas ovulaciones. La progesterona también actúa sobre el endometrio para favorecer la anidación del embrión y el mantenimiento de la gestación. Si el ovocito no es fecundado y la vaca no queda gestante, entonces el útero libera PGF₂ α entre los días 16 y 17 con la consecuente luteólisis e inicio de un nuevo ciclo.

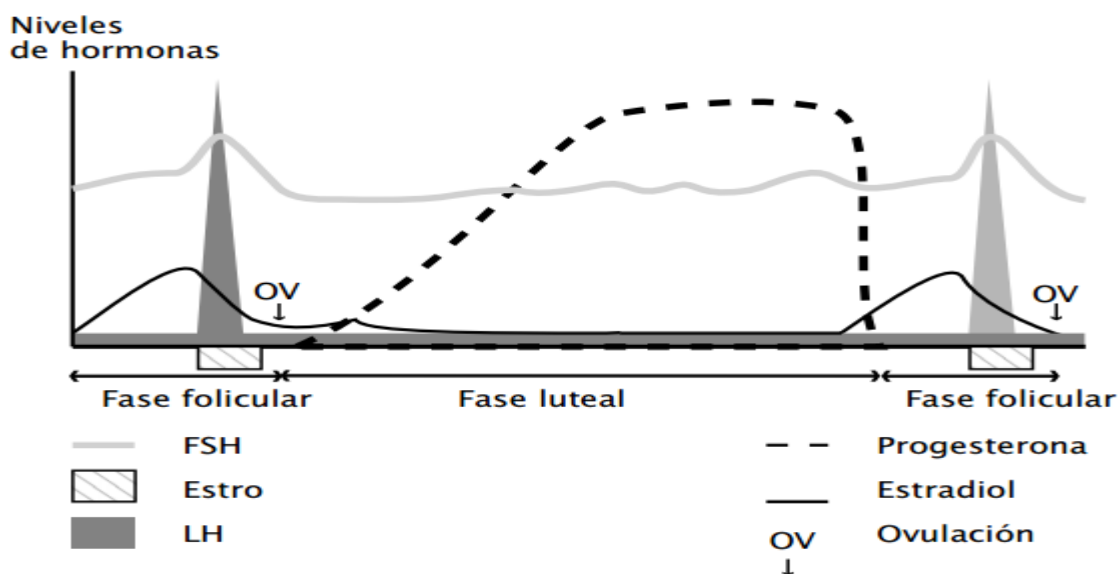


Figura 2. Niveles de hormonas durante el ciclo estral de la vaca. Fuente: Compendio de reproducción animal (INTERVET. 2007).

Cuando el cuerpo lúteo se destruye, los niveles de progesterona descienden, como resultado de esto, se activa la liberación de GnRH e inicia una nueva fase folicular. Normalmente, mientras una vaca o vaquillona no quede gestante, tendrá un ciclo estral de 21 días.

Las vaquillonas tienen un ciclo estral ligeramente más corto que las vacas y este ciclo continúa hasta que la vaca o vaquillona quede gestante. Después del parto, las vacas pasan por un periodo de 20 a 30 días en el que no se presentan ciclos estrales, conocido como puerperio. Este periodo puede ser mayor en vacas de alta producción cuando no son capaces de obtener suficiente energía para cubrir sus necesidades nutricionales. Estas vacas están en anestro, lo que significa que sus ovarios no funcionan y por lo tanto no se observan en celo. Además, algunas vacas padecen alteraciones del ciclo. Tal es el caso de las vacas que desarrollan quistes ováricos, las cuales presentan celo en intervalos muy cortos de tiempo y con una duración del celo de tres a cuatro días (Becaluba, 2007; Iñiguez, 2011).

1.3 Dinámica folicular ovárica

Una onda de desarrollo folicular se puede definir como el desarrollo armónico y simultáneo de varios folículos antrales pequeños, en promedio 24 por onda con un rango de 8 a 41, funcionando a través de estadios integrados de reclutación, selección y dominancia folicular. El reclutamiento es un proceso por el que, bajo la responsabilidad de la FSH, un conjunto de folículos antrales tempranos (2-3 mm de diámetro) comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrófico que les permita progresar a la ovulación. La selección es un proceso por el cual un único folículo evade la atresia y adquiere competencia para alcanzar la ovulación. La dominancia es el medio por el cual el folículo seleccionado inhibe el reclutamiento de una nueva serie de folículos. El reclutamiento no ha sido investigado profundamente como la dominancia folicular y la ovulación. Grupos, más que folículos aislados, son reclutados y este proceso se relaciona con cambios medibles de la FSH circulante. Factores intraováricos estimulados por la FSH están involucrados en el proceso de reclutamiento folicular y los IGF (Factores de crecimiento ligados a la insulina) y sus proteínas de enlace (IGFBP) han sido implicados en la amplificación de la acción de la FSH (Fernandez Tubino, 2003; Intervet, 2007). (Para descripción de las hipótesis de la dominancia ver Fernandez Tubino, 2003).

Según Ginther et al., (1996) el folículo dominante es anovulatorio si ocurre durante la fase luteal y ovulatorio si ocurre en la fase folicular. Durante un ciclo estral ocurren de 2 a 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular, y el folículo preovulatorio deriva de la última (Figura 3). Este proceso empieza con el reclutamiento en el cuál una cohorte de folículos comienza a madurar en un medio con un aporte adecuado de gonadotrofinas que le permiten avanzar hacia la ovulación (Sintex, 2005).

Existen vacas con 2, 3 y hasta 4 ondas foliculares. Esto determina que existan diferencias en la duración del ciclo estral. En las vacas con 2 ondas el ciclo dura de 18 a 20 días. En las vacas con 3 ondas, 21 a 23 días y en las vacas con 4 ondas, 24 - 25 días (Iñiguez, 2011). La causa por la cual degenera el folículo dominante de la primera onda (ciclo de 2 ondas) y los folículos dominantes de la primera y segunda onda (ciclos de 3 ondas) sería la presencia de una baja frecuencia de los pulsos de LH debido a los altos niveles de progesterona. Un folículo se hace dominante hacia el tercero o cuarto día cuando alcanza los 8.5 mm de diámetro. Los demás folículos que comenzaron la onda folicular pero no alcanzaron el diámetro de 8.5 mm regresan y experimentan atresia (Iñiguez, 2011). De acuerdo a Tríbulo y col., (2003) se desconoce hasta el momento el papel biológico y la significación de los ciclos de 2 y 3 ondas. Se ha sugerido que la producción de estrógenos por parte del folículo dominante de la primera onda del ciclo regularía de alguna manera el transporte del ovocito hasta el útero. En ciclos de 2 y 3 ondas, los folículos de la segunda onda, inducirían la formación de receptores de oxitocina en el útero, necesarios para la síntesis y liberación posterior de PGF2 α por parte de este órgano. De cualquier manera, ha quedado demostrado que los folículos dominantes de cualquier onda del ciclo son capaces de ovular, lo que es igualmente importante, que la fertilidad subsiguiente a la ovulación de cualquiera de estos folículos es muy similar.

La primera onda folicular inicia el día 0 inmediatamente después de la ovulación del ciclo anterior, la segunda entre los 8 y 10 días y la tercera entre los 15 y 16 días. El folículo dominante de la primera onda folicular es siempre anovulatorio, porque se encuentra en presencia de un cuerpo lúteo. Esto se debe a que la progesterona producida por el cuerpo lúteo hace un bloqueo en el hipotálamo que evita que se libere la LH y la ovulación no sucede. Alrededor del día 16 la regresión del cuerpo lúteo permite que el folículo dominante de la segunda o tercera onda folicular alcance la ovulación. Durante la etapa final del proceso de maduración, la secreción de estradiol por parte del folículo dominante es tan elevada que hace que la vaca manifieste el celo. La ovulación es la liberación del ovocito tras la ruptura del folículo maduro, sucede 24 horas después del pico de LH. Tras la ovulación, el ovocito es recogido por el infundíbulo del oviducto y luego va a la porción

ampular del oviducto donde se produce la fecundación y es transportado hasta el útero (Iñiguez, 2011).

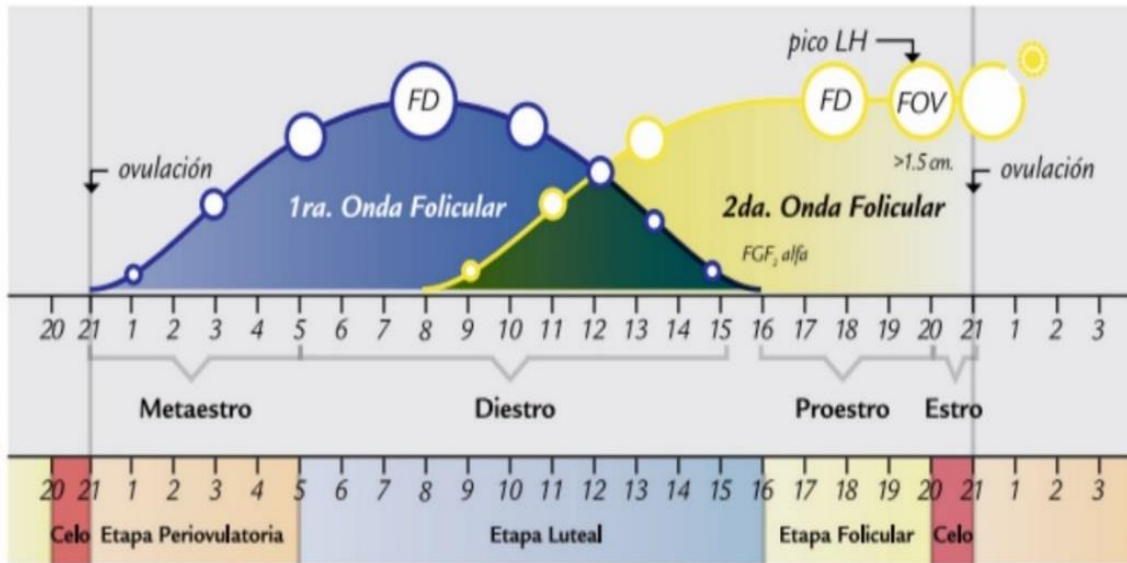


Figura 3. Dinámica folicular bovina. Fuente Iñiguez, 2011

2. Superovulación en Bovinos

Se denomina superovulación (SO) al aumento del número fisiológico de ovulaciones propias de la especie, provocado por la administración de gonadotropinas, aplicadas en forma intramuscular o subcutánea. En el bovino se considera una respuesta al tratamiento cuando se producen múltiples ovocitos en un solo ciclo estral. El hecho de que la especie bovina sea monovular imposibilita la obtención de varios descendientes de manera natural en corto tiempo a partir de una hembra genéticamente superior (Cobodevilla y Torquatri 2001).

Existen básicamente dos métodos generalmente aceptados de superovulación en ganado bovino. Uno consiste en una sola administración de una inyección intramuscular de 2,000–2,500 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG), típicamente en el día 10 del ciclo estral (donde el día 0 se define como el día en que las vacas entran en celo), seguido 2 a 3 días más tarde por 2 inyecciones de PGF_{2α} (Dinoprost o Cloprostenol) con 12-24 horas de intervalo. El otro método consiste en la administración de FSH.

La respuesta superovulatoria inducida por la eCG es a menudo mayor que la inducida por FSH; sin embargo, se producen más embriones transferibles de buena calidad después del tratamiento con FSH (Selk, 2013).

Los preparados comerciales disponibles comúnmente contienen FSH. Esta es inyectada dos veces al día durante 4 días, 8 a 14 días después del estro, con un cuerpo lúteo funcional en uno de los ovarios. Al tercer día del tratamiento se aplica una inyección de PGF_{2α}, la cual causará la regresión del cuerpo lúteo, con la consiguiente entrada en celo entre las 48 a 60 horas después (Selk, 2013). En este momento, la vaca suele producir 7-20 o más ovocitos viables con un promedio de 5-15 o más que son transferibles (Rincker, 2013).

2.1 Objetivos de la técnica de superovulación

El objetivo principal de los tratamientos de superovulación en vacas es producir un gran número de folículos ovulatorios, que van a generar un mayor número de oocitos, para obtener el máximo número de embriones transferibles o trasplantables (Adams, 1992).

Esta técnica permite la producción de varios embriones en el mismo ciclo estral, difiriendo de la producción unitaria que alcanza una hembra bovina en cada ciclo (Ereno, 2002). La eficiente

respuesta al tratamiento superovulatorio es la condición fundamental para que un programa de transferencia de embriones tenga éxito. Las vacas o novillas que son apropiadamente tratadas pueden liberar 10 o más ovocitos viables durante el estro. Aproximadamente el 85% de las hembras responderá al tratamiento superovulatorio con un promedio de 5 embriones transferibles (Machado et al., 2003).

Según Demetrio et al., (2007) la transferencia de embriones frescos es una herramienta importante para aumentar la probabilidad de concepción en vacas lecheras de la raza Holstein ya que puede suprimir los efectos negativos de la producción de leche y la baja concentración de progesterona (P4) en el embrión temprano. La superioridad de la TE vs. IA es más evidente en vacas de alta producción.

En general, la superovulación seguida de la IA, puede ser usada para obtener numerosos embriones de donantes seleccionadas. Esta técnica, asociada a la TE, representan herramientas poderosas para diseminar genotipos superiores. Sin embargo, existe una necesidad de simplificar los protocolos de superovulación y de TE, específicamente reduciendo la manipulación animal, sin comprometer la producción de embriones y las tasas de preñez (Córdoba-Salinas, 2011).

2.2 Factores que afectan la superovulación en bovinos

La respuesta superovulatoria es una de las variables de mayor importancia en el éxito de un programa de TE. Muchos factores pueden influir en las respuestas de las hembras donantes a la superovulación y en la generación de un alto número de embriones fertilizados de buena a excelente calidad. Además de la genética, la nutrición es probablemente el factor aislado más importante que influye en la respuesta superovulatoria de la hembra donante. Es importante asegurar que las vacas se mantengan en un plan de nutrición positivo y sean alimentadas con una dieta que asegure el mantenimiento de los requerimientos (Velazquez, 2011).

Entre otros factores que afectan tanto la respuesta superovulatoria como la producción de embriones, hay que considerar la raza, la edad, el estado nutricional, la sanidad, el estado reproductivo, etc. Igualmente, se deben considerar aquellos factores relacionados con el propio tratamiento de superovulación, como son el tipo y dosis de hormonas, superovulaciones repetidas y sus respuestas (Mogollón-Waltero & Burla-Dias, 2013).

La variabilidad en la respuesta de las donadoras de embriones a tratamientos superestimulatorios con gonadotrofinas continúa siendo uno de los mayores problemas en los programas comerciales de transferencia de embriones (Barros et. al, 2001). Esto se debe al estrés provocado por las múltiples inyecciones diarias. Una hormona como la eCG requiere una sola aplicación, pero con resultados poco consistentes. Utilizando una hormona que presenta mejores resultados, pero requiere múltiples aplicaciones como la FSH, se aumentan los problemas de estrés. Siendo así, la situación ideal sería utilizar FSH en una dosis única que permita garantizar su lenta liberación durante el tiempo apropiado para la estimulación del crecimiento folicular múltiple (Mogollón-Walero & Burla-Dias, 2013).

El estrés es responsable de diversas alteraciones fisiológicas en los animales, incluyendo la subfertilidad. La interferencia del estrés en el rendimiento reproductivo de los bovinos muestra mayor importancia cuando se emplea manejo intensivo. Además, tanto el cortisol (principal hormona indicadora de estrés) como la progesterona son liberados por la glándula adrenal en condiciones de estrés. En los bovinos, se considera como valor basal de cortisol 10 ng/ml, y ha sido demostrado que los manejos en corral elevan los niveles plasmáticos de esa hormona por encima de ese valor (Maziero et al., 2007).

Adicionalmente al estrés por manejo, en las regiones tropicales debe considerarse el estrés producido por altas temperaturas, que, en algunos casos, es capaz de producir largos periodos de aciclicidad (niveles de progesterona <1 ng/ml), o la ocurrencia de ciclos irregulares y, sobre todo, ciclos de corta duración (Waltero, 2013; Wolfenson et al., 1995). Según Demetrio y col., (2007) la alta temperatura corporal medida el día 7 tuvo un efecto negativo sobre la tasa de concepción y retención de embriones. Siendo así, se concluye que el estrés calórico afecta negativamente la dinámica ovárica (Torres-Junior, et al., 2007).

Segundo Monnlaux et al., 1983, el estrés por transporte de animales causa disminución del número de cuerpos lúteos en las novillas superovuladas con incremento en las concentraciones plasmáticas de cortisol.

De acuerdo a Mapletoft et al., (2002) la mayor fuente de variabilidad en la respuesta superovulatoria en el ganado es el estado de los folículos ováricos al inicio del tratamiento con gonadotropinas. En ese momento, la existencia del folículo dominante (determinado por medio de ultrasonografía) inhibe el desarrollo del resto de folículos y disminuye la respuesta superovulatoria (Grasso et al., 1989; Guibault et al., 1991; Huhtinen et al., 1992; Bo et al., 1996). Sin embargo, las precauciones recomendadas y los tratamientos para eliminar su efecto y provocar así un incremento

del número de embriones transferibles no aumentaron la producción de embriones in vivo (Adams et al., 1994; Nasser et al., 1993, Hasler, 2000).

Las altas tasas de ovocitos sin fecundar es otro de los factores negativos asociados a los tratamientos superovulatorios. Ello fue atribuido a alteraciones de la maduración como consecuencia del desorden bioquímico y motriz existentes en el oviducto y el útero. Estos factores provocan una gran variabilidad de la respuesta superovulatoria que afecta negativamente el éxito y con ello el costo de la técnica (Palma, 2001). Sin embargo, los mayores inconvenientes que se presentan en los programas de selección es la necesidad de comenzar la superestimulación en un momento determinado del ciclo estral y la poca consistencia en la producción de embriones viables por las donantes, sobre todo cuando se considera que entre un 20 y 30 % de las donantes no produce ningún embrión transferible. Esta variabilidad puede estar influenciada por factores relacionados con el tratamiento superestimulador o en mayor medida por factores individuales asociados a las características de la dinámica folicular ovárica (Bó & Mapletoft, 1999).

Las diferencias entre especies también deben ser consideradas cuando se planean programas de superovulación y de transferencia de embriones. Por ejemplo, *Bos taurus* y *Bos indicus* tienen varias diferencias en su fisiología reproductiva. Específicamente, *B.indicus* tiene una gran sensibilidad a las gonadotropinas, una menor duración del estro, y más comúnmente expresa celo durante la noche. El *B.indicus* en comparación con *B. taurus* tienen un mayor reclutamiento folicular por onda folicular (30 a 60 vs 15 a 33 respectivamente), un menor diámetro del folículo dominante (FD) (6 mm vs 8.5mm) y una adquisición de la capacidad ovulatoria después de la inducción con LH (7 a 8.4 mm vs. 10 mm). Además, un menor diámetro máximo del FD (10 a 12 mm *Bos indicus* vs 14 a 20 mm del *Bos taurus*), esto ha sido asociado a un menor cuerpo lúteo (CL) (17 a 21 mm para *B. indicus* vs 20 a 30 mm para *B. Taurus* (Kaiser et al., 2015).

Los programas tradicionales de superovulación aún presentan algunas limitaciones como: manejo para detección de celo; la necesidad de iniciar el tratamiento superestimulador en momento específico del ciclo estral; la necesidad de detección del celo para inseminación de las hembras superestimuladas y baja repetitividad en la producción de embriones viables por donante, dado que cerca del 20 a 30% de las donantes no responden al tratamiento (Baruseli et al., 2008).

Teniendo en cuenta que se practica hace aproximadamente 35 años, fueron pocos los progresos cualitativos y cuantitativos que se lograron en los últimos 20. Posiblemente ello se deba a la complejidad de factores que afecta la respuesta hormonal (Hasler, 1992; Palma et al., 1995).

2.3 Selección de hembras donantes

El primer paso en la transferencia de embriones es la selección de la hembra donante. La hembra donante de embriones ha sido uno de los puntos más estudiados en los programas de TE. Debido a esto, se han realizado gran número de investigaciones lográndose importantes avances en materia de selección de este tipo de animales, así como en la sincronización del ciclo estral, técnicas de multiovulación, inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), para obtener mejores resultados en la colecta de embriones bovinos, ya que este es el producto final que se obtiene de la hembra donante (Diuca et al., 2007)

De acuerdo con la FAO (2010), existen dos amplios criterios para la selección de las donantes en la mayoría de los programas de transferencia, los cuales son:

- a) superioridad genética, de aquellos animales que contribuyen a los objetivos genéticos programados, y
- b) la probabilidad de producir un gran número de embriones utilizables.

En la mayoría de los programas de transferencia de embriones, la superioridad está determinada en la práctica por las fuerzas del mercado. Aunque la escasez y la promoción tienden a influir en el valor, el verdadero valor genético es la habilidad para transmitir rasgos deseables, y esta debe ser la consideración a largo plazo más importante.

Según Mapletoft (1985) la selección debe ser basada en tres criterios: superioridad genética, habilidad reproductiva y el valor en el mercado de la progenie. Los criterios de selección de los productores de carne podrán diferir entre sí en cuanto a lo que consideran una hembra genéticamente superior. Ya sea en base a registros de performance o a la conformación, o ambos criterios, la selección será siempre considerada en base al valor potencial económico de los terneros. Dado que el ganado para producción de leche es seleccionado habitualmente para un rasgo importante (producción de leche), las decisiones relativas a las vacas donantes son en realidad algo menos complicadas que en ganado de carne. Sin embargo, las consideraciones económicas son igualmente importantes.

Además de la superioridad genética, se deben tener en cuenta en la elección de las hembras donantes factores como ciclos estrales regulares, precocidad reproductiva, dos o menos servicios por concepción en los años anteriores, comportamiento individual superior a la media del grupo en características de importancia productiva (peso al destete, al año y a los dieciocho meses), que

produzca crías superiores a la media del rodeo, especialmente comparado con las hermanas de la hembra (descendientes del mismo toro), ningún problema al parto, ninguna irregularidad reproductiva, así como ningún defecto genético o de conformación detectable (Bó, 2002; Duica et al., 2007). Además, deberá mantener un nivel nutricional adecuado a su peso o al nivel de producción de leche. Tanto la vaca obesa como la vaca flaca tendrán problemas de fertilidad, por lo que es importante que la hembra donante tenga una adecuada condición corporal en el momento de la transferencia (Selk, 2013).

La lactación en vacas de carne o en vacas lecheras no disminuye la respuesta superovulatoria mientras estas estén ciclando o no pierdan de peso. Las vacas extremadamente gordas son pobres donantes porque no responden bien a la superovulación, como también porque su tracto reproductivo es más difícil de manipular (Hasler *et al.*, 1987). Según Gómez (2005), las hembras donantes deben ser incluidas en un programa de nutrición balanceada antes de efectuar el proceso de superovulación, donde se debe procurar administrar forrajes que brinden al animal los nutrientes necesarios para que se cumplan las funciones reproductivas, además de la incorporación de productos que proporcionen al animal adecuados niveles energéticos en la dieta, suplementos vitamínicos y minerales. Todos estos factores acompañados de un excelente manejo sanitario garantizaran óptimos resultados en el proceso de obtención de embriones.

Otro aspecto importante es la determinación del estado sanitario, o determinar qué tipo enfermedades pueden estar presentes en la hembra, ya que los embriones, además de transportar una valiosa información genética, también pueden ser fuente de diseminación de enfermedades reproductivas, tales como la rinotraqueitis infecciosa bovina IBR (Virus herpes bovino tipo 1), el virus de la diarrea viral bovina (DVB), la leucosis enzootica bovina (LEB), agentes bacterianos como *Brucella abortus*, *Campylobacter foetus subsp venerealis*, *Leptospira interrogans* y de otras bacterias como *Streptococcus agalactiae*, *Actinomyces pyogenes* y *E. coli*, ya que el agente infeccioso va a estar presente en las células embrionarias o asociado con la zona pelúcida (Stingfellow, 2000 a; b).

En los mamíferos, la zona pelúcida consiste en una matriz extracelular o “cubierta externa” que rodea a los ovocitos pre y ovulatorios, y a los embriones jóvenes hasta la fase de blastocisto cuando inicia la eclosión, que es cuando se fracciona esta área. Los embriones salen de zona pelúcida entre los ocho y los nueve días de edad, y son colectados para ser transferidos el día 7 pos IA (Gordon, 1999; Jiménez, 2005). También se debe verificar que la hembra donante tenga un período postparto mínimo de 60 días, para que se garantice una efectiva involución uterina y muestre buena ciclicidad reproductiva (Gonzalez-Stagnaro, 2001).

Es de extrema importancia que no se encuentre con un ternero, para evitar el estrés de la lactancia y cuidados propios de un ternero al pie, logrando así un mayor rendimiento de la madre en este proceso biotecnológico (Palma, 2001).

Gran parte de las investigaciones se han dirigido al estudio de factores como el tipo de gonadotropina a ser utilizada en el protocolo de apoyo hormonal, evaluando cuál es más efectivo para producir ovulaciones múltiples con ovocitos de buena calidad, que generen un embrión excelente después de la fecundación. Para una superovulación exitosa, es importante el desarrollo y el número de los folículos presentes a nivel ovárico al momento de la evaluación de la respuesta de la hembra donadora al tratamiento hormonal, por eso deberán hacerse evaluaciones de los tamaños de las estructuras ováricas a lo largo de las diferentes etapas de la técnica de TE (Bó, 2003).

Cualquier vaca madura que cicle es capaz de ser incorporada a un programa de transferencia. El único problema que puede impedir una vaca o novilla de ser superovuladas son anomalías en el tracto reproductivo o anomalías secundarias debido a enfermedades o lesiones (Hasler, 1992).

Independientemente del criterio, el valor de los terneros de una donante debe ser alto lo suficiente para justificar el gasto adicional. Según Grimes (2008), el criterio de selección también puede ser basado en el rendimiento, fenotipo, relación con otras hembras destacadas, o alguna combinación entre estos factores. Rincker (2013) declaró que las características buscadas en una donante varían de acuerdo al tipo de ganado. En muchos casos pueden utilizarse medidas de superioridad genética, por ejemplo, producción de leche, composición de la leche, tasa de crecimiento, facilidad de parto y resistencia a enfermedades. Como la superioridad fenotípica puede no indicar superioridad genética, suele ser conveniente consultar a alguien capacitado en la cría de animales para que las mejores donantes sean seleccionadas para cumplir con los objetivos (Hasler, 1991).

2.4 Selección de hembras receptoras

Los resultados positivos de un sistema de TE, se ven afectados por una serie de factores como los inherentes a la donante, al embrión, a la aplicación de la técnica y a las hembras receptoras, quienes reciben un embrión extraño a nivel uterino, permitiendo su desarrollo gestacional. Existen una variedad de parámetros que deben ser evaluados en la hembra receptora como son: raza, edad, estado fisiológico, sanidad, peso, integridad del tracto reproductivo y manejo. Es además de gran

importancia hacer un seguimiento de las estructuras ováricas presentes durante la sincronización del estro, así como de las etapas previas y posteriores a trasplantar el embrión. De este modo, un óptimo desarrollo folicular será determinante para la formación de un cuerpo lúteo que genere concentraciones plasmáticas de progesterona suficientes para ofrecer un medio ambiente uterino adecuado y favorecer el óptimo desarrollo embrionario. Al tener en cuenta los factores que afectan la eficiencia de la técnica de trasplante de embriones, se obtendrá un aumento en los resultados positivos representados en gestaciones y nacimientos de individuos provenientes de animales de alto valor genético (Duica et al., 2007).

Gran parte de la atención en la investigación ha sido enfocado hacia la hembra donante de embriones en materia de TE, ya que se han aplicado un sin número de protocolos de sincronización del estro, técnicas de obtención, manipulación y preservación de los embriones, así como de protocolos de multiovulación en los que se han utilizado varios tipos de hormonas que desencadenan este efecto en el que se obtienen ovulaciones múltiples. Actualmente el criterio de selección de las hembras receptoras es más estricto por parte de los profesionales que aplican esta técnica lo cual ha sido comprendido por los productores que utilizan esta biotecnología en busca de realizar mejoras en sus explotaciones mediante la aplicación de TE.

Las hembras receptoras deben ser saludables y reproductivamente sanas (Huertas, 1991). Se debe verificar la presencia de estructuras que demuestren ciclicidad a nivel ovárico, rechazando además animales con anormalidades (órganos sexuales juveniles, hermafroditismo, ninfomanía, endometritis, entre otros) comprobando que no presenten alteración ni deformidad a nivel de cuello uterino. Por otro lado, deben presentar un chequeo serológico negativo a las enfermedades infectocontagiosas que afecten las características reproductivas. Si se utilizan hembras en período de postparto, estas deben presentar un útero libre de infecciones, debe haber pasado por lo menos tres meses de haber ocurrido su último parto y no estar en etapa de amamantamiento a la cría. Las hembras receptoras deben tener un comportamiento estral cíclico y no presentar sobrepeso (Hafez, 2000), ya que estos, son factores que afectan directamente el desempeño; estas hembras ciclando no deben ser expuestas a la presencia de toros y se debe contar en el plantel en donde se practique TE un sistema de identificación simple, efectivo y permanente. Así mismo debe llevarse a cabo un excelente programa de detección de celos, contar con un personal capacitado para el manejo de los animales y contar con unas buenas instalaciones para realizar un manejo adecuado de las hembras (Gómez, 2005).

En la evaluación de las estructuras ováricas en las hembras receptoras de embriones por medio de ultrasonografía transrectal, se ha podido determinar que el folículo preovulatorio afecta de

manera directa el subsecuente tamaño del cuerpo lúteo, observando que un folículo preovulatorio de 1,3 cm da paso a un cuerpo lúteo que el día siete mide 5mm y produce niveles de progesterona plasmáticos de 1,22 ng/ml y el día 14 el cuerpo lúteo mide 6 mm y genera concentraciones plasmáticas de progesterona de 2,48 ng/ml. Así mismo, un folículo preovulatorio de mayor tamaño (1,6 cm) da paso a un cuerpo lúteo que el día siete mide 6 mm y produce unos niveles de progesterona plasmáticos de 1,61 ng/ml y el día 14 el mismo cuerpo lúteo mide 9 mm, generando unas concentraciones plasmáticas de 3,05 ng/ml. Así, al haber una mayor producción de progesterona plasmática se espera generar condiciones uterinas más favorables para el desarrollo embrionario temprano. Por eso es importante determinar el tamaño de las estructuras ováricas antes de realizar el trasplante del embrión a la hembra receptora, mejorando los resultados después de la aplicación de la técnica de TE (Vasconcelos, 2001).

Según un trabajo de Baruselli, et al., (2001) al realizar el seguimiento de las estructuras ováricas por medio de ultrasonografía a un grupo de 140 animales, los cuerpos lúteos de más de 2 cm de diámetro produjeron niveles de progesterona circulantes de 2,44 ng/ml y una tasa de concepción del 58% en hembras a las que se le transfirió un embrión el día siete postcelo. Las hembras a las cuales se encontraron cuerpos lúteos de 1,5 cm de diámetro tenían niveles de progesterona circulantes de 1,75 ng/ml y una tasa de concepción del 41%. Las hembras a las que se les encontraron cuerpos lúteos menores de 1,5 cm de diámetro presentaron niveles de progesterona circulantes de 1,19 ng/ml, y una tasa de concepción del 31%. Mientras que al encontrar un cuerpo lúteo de 2,36 centímetros de diámetro se detectó una concentración plasmática de progesterona equivalente a 4,2 ng/ml y una tasa de preñez del 70%, en hembras receptoras de embriones a las que se les fue transferido el embrión el día siete postcelo (Spell, 2001).

2.5 Superovulación de la hembra donante

Antes de iniciar el tratamiento para la SOV, las siguientes condiciones deben ser cumplidas para tener éxito en la producción de muchos embriones de buena calidad. Deberá comprobarse la normalidad del ciclo estral, para ello deben observarse por lo menos 2 ciclos estrales. La donadora debe mostrar el celo y el intervalo debe ser normal, es decir, entre 18 y 24 días (Gong et al. 1991). Se debe confirmar que no presente ninguna inflamación uterina como endometritis. La endometritis subclínica a veces es difícil de detectar por lo tanto debe realizarse una palpación del útero en la fase lútea, a veces es necesaria la inspección del moco uterino durante el celo. La superovulación

puede iniciarse entre los días 9 a 14 del ciclo estral en las donadoras que presenten un buen CL. Ovarios pequeños y de parénquima firme puede resultar en una baja respuesta al tratamiento, debido a que el ovario presenta menor número de vesículas foliculares que son los que responden al tratamiento superovulatorio (Gong et al., 1991).

Experimentos y pruebas de campo realizados durante la década del 80, llevaron a la conclusión general que los tratamientos superestimulatorios comenzados durante los días 9 o 10 después de detectarse el celo resultan en una mejor respuesta superovulatoria que aquellos iniciados antes (días 2 a 6) o después (día 12 o 13). Esto es debido a que durante el ciclo estral bovino hay 2 o 3 (a veces 4 en el cebú) ondas de desarrollo folicular y en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza, en promedio, entre los días 9 y 10 (Becaluba, 2007). No obstante, hay una gran variación individual y la segunda onda puede comenzar más temprano (día 6) o más tarde (día 12).

Estudios realizados durante los últimos 5 años han demostrado claramente que los tratamientos superovulatorios deben iniciarse al comienzo de una onda de desarrollo folicular, antes de la selección del folículo dominante, para obtener la mejor respuesta posible (Bó y Mapletoft, 1999). Según Bó y Mapletoft (1999) la respuesta superovulatoria fue significativamente mayor cuando los tratamientos se iniciaron el día antes o el día de comienzo de la onda folicular (ya sea de la primera o segunda onda) que los tratamientos iniciados 1 o 2 días después. Si se tienen en cuenta estos resultados, la probabilidad que el comienzo de la superestimulación coincida con el inicio de la onda folicular es menor al 20 % (1 de 5 o 7 días) y significa que el 80-90 % de las veces no inician los tratamientos superovulatorios en el período óptimo. Además, la necesidad de sincronizar el celo previo (o "base") en grupos de donantes para comenzar los tratamientos 8 a 12 días después, implica mayor trabajo del personal, más demora en la programación y el riesgo de una dispersión de celos que obligue a colectar embriones en distintos días (Garzon et al., 2007).

Otra alternativa viable para lograr una mejor respuesta superovulatoria y obviar los problemas logísticos de programación, es controlar la dinámica folicular y comenzar los tratamientos en el momento más oportuno (que el veterinario disponga, no la vaca). En este sentido, alternativas para controlar la emergencia de la onda folicular en un estado aleatorio del ciclo estral, sin necesidad de detectar el celo para establecerlo como base, podría facilitar el manejo de las donantes *B. indicus* y posibilitaría un aumento en la eficiencia de los programas de transferencia de embriones en vacas Cebú (Garzón, et al., 2007).

La dinámica folicular bovina se puede controlar por varios métodos. La mayoría de los tratamientos estudiados han sido orientados hacia la eliminación del efecto del folículo dominante

(por métodos físicos u hormonales) y de esta manera permitir el comienzo de una nueva onda folicular en un determinado período conocido. Un método mecánico es la aspiración de todos los folículos mediante ultrasonografía transvaginal (también llamado ablación folicular) que resulta en el comienzo sincrónico de una onda folicular 1,5 días después. Dentro de los métodos hormonales se ha reportado la utilización estrógenos y progestágenos que inducen la supresión de los folículos antrales presentes (Bó y Mapletoft, 1999). Este método fue desarrollado en la década del 90 (progestágenos y esteres de estradiol) para inducir la atresia de todos los folículos y el comienzo de una nueva onda folicular 4 días después (Bó et al, 1994b; 1995; 1996). Sin embargo, este tratamiento, ha sido restringido recientemente en algunos países como USA, Nueva Zelanda y los de la Unión Europea (Lane et al., 2008).

La variabilidad en la respuesta superovulatoria, el tiempo y el esfuerzo necesario para el tratamiento y la detección del celo, han sido los principales factores limitantes que afectan al éxito de la tecnología de transferencia de embriones en los programas de mejoramiento genético. Aunque el reciente desarrollo de protocolos que permiten el control de la emergencia de la onda folicular y la ovulación no han eliminado la variabilidad a la respuesta superovulatoria, estos tratamientos han tenido un impacto positivo en la aplicación comercial, en el campo de la transferencia de embriones, ya que permite el inicio del tratamiento en el momento que nosotros lo proponemos (Bó et al., 2002; 2006; Mapletoft et al., 2002). Además, los protocolos que sincronizan la ovulación han permitido la inseminación artificial de la donante a tiempo fijo, evitando así la necesidad de la detección de celo durante el protocolo de superestimulación (Baruselli et al, 2006, Bó et al, 2006). De esta manera, los tratamientos son ahora más sencillos y fáciles de aplicar por el personal de un establecimiento, y no depende de la eficiencia de la detección del celo. Sin embargo, el método más comúnmente utilizado para la sincronización de la emergencia de la onda folicular para la superestimulación (es decir, el tratamiento con estradiol), no puede ser utilizado en muchos países del mundo debido a las preocupaciones sobre los efectos de sustancias estrogénicas en la cadena alimentaria (Lane et al., 2008).

2.5.1 Sincronización del inicio de la onda folicular

2.5.1.1 Estrógenos y Progestágenos

La capacidad de inducir la emergencia de la onda folicular permite el inicio de tratamientos superestimulatorios sin tener en cuenta el momento del ciclo estral y elimina la necesidad de la

detección de celos o de esperar de 8 a 12 días para iniciar los tratamientos con gonadotrofinas (Mapletoft et al., 2009).

En Sudamérica son comercialmente aprovechables diferentes ésteres de estradiol, incluyendo el benzoato de estradiol (EB), el valerato de estradiol (EV) y el cipionato de estradiol (ECP). Todos han demostrado inducción de la regresión folicular cuando son administrados en presencia de altas concentraciones de progesterona (P4) en plasma (Eckery et al., 1994). El EV posee una vida media más larga, lo que resulta en un intervalo más variable para la emergencia de onda folicular que el EB que posee una vida media más corta (Colazo et al., 2005); Ejemplo de la utilización de ECP y de EB pueden verse en Aguilar et al., 2011 y Veiga et al., 2011.

Como anteriormente mencionado, en los años 90, se iniciaron tratamientos para inducir la sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular mediante la utilización de progestágenos y estradiol (Bó et al, 1994b; 1995; 1996). Este método para la superovulación en bovinos ha sido ampliamente descrito por varios autores (Bó et al., 2002; Mapletoft et al., 2002; 2007). El tratamiento hormonal más común es aquel que usa estradiol 17 β (E-17 β) o BE combinado con P4, inyectados en el mismo momento de la inserción de un dispositivo intravaginal de liberación de P4. Esto ha sido utilizado por los profesionales de todo el mundo, y ha sido incorporado en los protocolos que permiten la IATF de las donantes (Bó et al., 2006; Baruselli et al., 2006).

La posibilidad del uso de estrógenos y progestágenos para controlar el desarrollo folicular se basa en el potente efecto supresor de la combinación de estos esteroides sobre las gonadotrofinas. Los primeros estudios tuvieron como objetivo determinar la eficacia del tratamiento con progestágeno y estradiol-170 (E-170) para suprimir el desarrollo del folículo dominante y de esta manera sincronizar el desarrollo de una nueva onda folicular (Becaluba, 2007).

Según Bó & Mapletoft (1999) el tratamiento con progestágeno y E-17 β , administrado en cualquier momento del ciclo estral, induce el crecimiento sincrónico de una nueva onda folicular, aproximadamente 4,3 días después y el E-17 β suprime el desarrollo folicular cuando es administrado un día después de la inserción de los implantes de progestágeno, o cuando es administrado en el mismo momento de la inserción del implante, pero en combinación con progesterona inyectable. De acuerdo con estos resultados, los autores mencionados realizaron una serie de experimentos para evaluar la respuesta superovulatoria en vacas y vaquillonas previamente tratadas con progestágenos y E-17 β .

El tratamiento hormonal más común para la sincronización de una nueva onda folicular para superovulación ha sido la administración de 5 o 2,5 mg de E-17 β o 2,5 mg de BE y 100 o 50 mg de progesterona por vía intramuscular en el momento de la aplicación del dispositivo intravaginal (Bó et al., 2002, 2006; Mapletoft et al., 2002). El tratamiento con estradiol provoca la supresión de la liberación de FSH y la atresia folicular. Una vez que el estradiol es metabolizado, surge la FSH y emerge una nueva onda folicular, aproximadamente 4 días después del tratamiento (Bó et al., 1995). El esquema siguiente puede resumir un protocolo de este tipo (Figura 4).

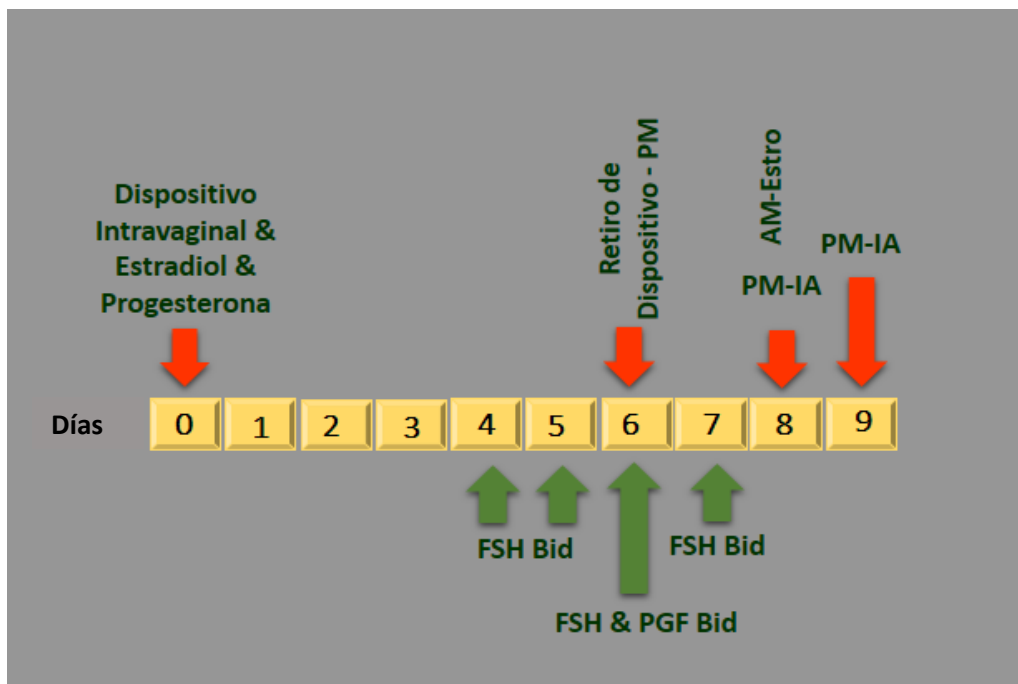


Figura 4. Esquema de un protocolo de inducción de superovulación con estradiol y progesterona

En una serie de experimentos donde los tiempos de ovulación fueron monitoreados por ecografía, Bó et al., (2006) mostraron cómo la sincronización de la emergencia de la onda folicular con estradiol podría ser incorporado a un protocolo de IATF en donantes, sin necesidad de detectar celos y sin comprometer los resultados. Esto se logra al retrasar el momento del retiro del dispositivo de progesterona para prevenir ovulaciones tempranas permitiendo de este modo el desarrollo de folículos de menor tamaño, seguido de inducción de la ovulación con GnRH o LH. La IATF en donantes, ha resultado ideal para los profesionales que utilizan la transferencia embrionaria (Larkin et al., 2006).

Entre los tratamientos superovulatorios usados en razas cebuinas se destaca el protocolo P-36, propuesto por Barros & Nogueira (2001), en el cual la fuente de progesterona CIDR-B o DIB se mantiene por hasta 36 horas después de la aplicación de PGF2 α , (de allí el nombre P-36) y la ovulación es inducida con LH exógena, administrada 12 horas después de la remoción de la fuente de P4 (es decir, 48 horas después de la administración PGF2 α). Como la ovulación ocurre entre 24 y 36 horas después de la administración de LH se programa la IA a tiempo fijo (IATF) 12 y 24 horas después de la pLH, evitando la necesidad de detectar celo (Barros et al., 2007), figura 5.

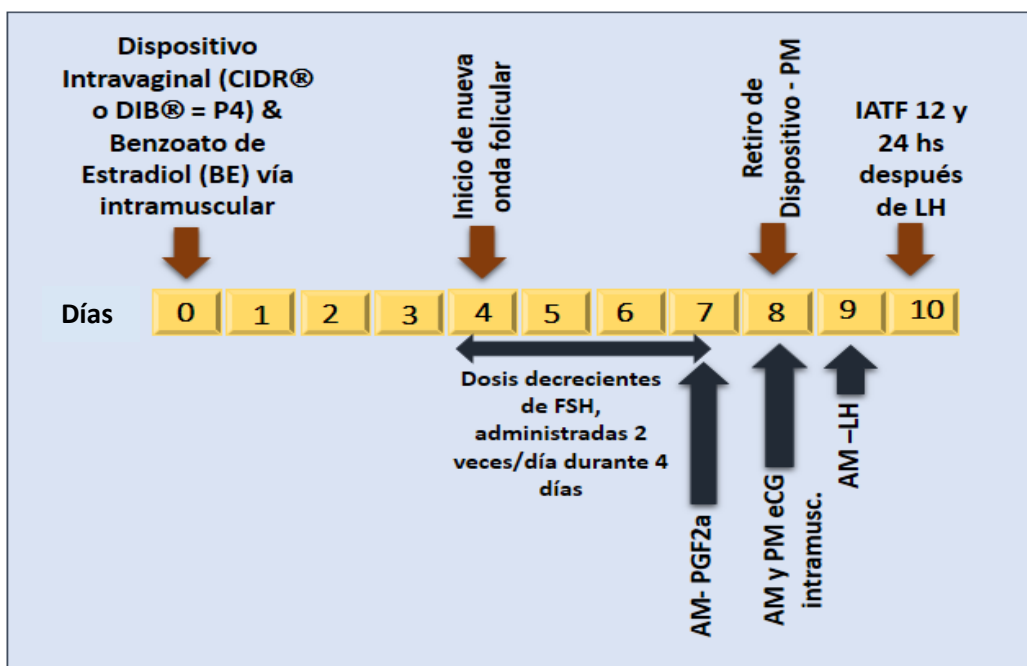


Figura 5. Protocolo P-36 según trabajo de Barros et al., 2007

En hembras de la raza Nelore ha sido utilizada una variación del protocolo P-36, según el cual el dispositivo intravaginal es retirado 24 horas después de la PGF2 α , que pasó, así, a ser llamado P-24 (Barros & Nogueira 2001). Esta variación puede tener resultados comparables con los de P-36, porque la capacidad ovulatoria en *Bos taurus indicus* es adquirida con diámetros inferiores a los observados en *Bos taurus taurus*. Sin embargo, la utilización del protocolo P-36 en razas europeas disminuyó el número de embriones viables, comparado con protocolos convencionales con observación de celo. Se realizaron así, ajustes a estos protocolos. Por ejemplo en vacas de las razas Holstein y Angus, el protocolo P-36 se mostró más eficaz cuando el agente inductor de la ovulación (LH o GnRH) era aplicado 60 horas después de la administración de PGF2 α (P36/LH60), en vez de

48 horas (P36/LH48) (Baruselli et al., 2006; Chesta et al., 2007). En la siguiente figura se puede ver un protocolo P-24 aplicado a vacas Brahman según Salgado et al., 2010).

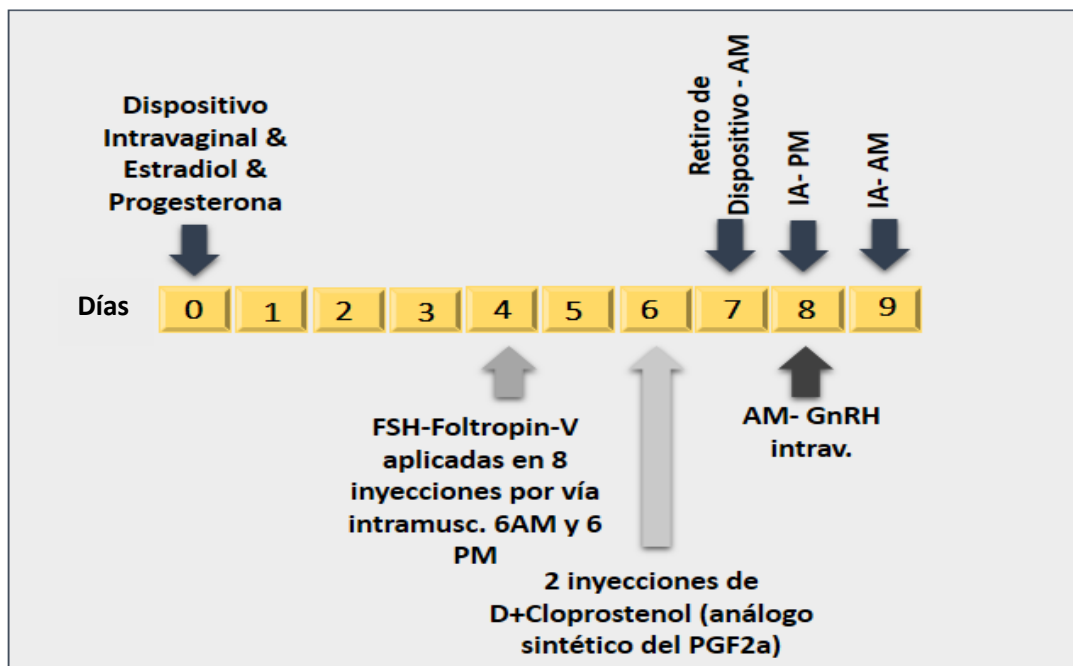


Figura 6. Esquema del protocolo P-24 seguido por Salgado et. al., 2010 en vacas Brahman con el objetivo de evaluar su eficiencia.

Estudios realizados en Brasil en rodeos de leche de alta producción indicaron que es preferible dejar el dispositivo con progesterona 12 horas adicionales antes de removerlo (es decir, el día 7 por la tarde) seguido por GnRH, 24 horas más tarde (es decir, el día 8 PM) con IATF, 12 y 24 horas más tarde (Bó et al., 2006).

En razas *Bos Índicus*, se encontró preferible la remoción del dispositivo en el día 7 PM, seguido de GnRH 12 horas más tarde (es decir, en el día 8 por la mañana). Siendo las donantes inseminadas dos veces, 12 y 24 horas después de la administración de GnRH o pLH, es posible utilizar una sola inseminación 16 horas después de la pLH (Baruselli et al., 2006). Sin embargo, se debe prestar especial atención a la calidad y la cantidad de semen que se utiliza en las donantes superestimuladas, a fin de evitar una disminución de la producción de embriones viables. Cuando se utiliza semen sexado, se usan dos dosis de semen en cada inseminación, la cual se realiza 18 y 30 horas después de la administración de pLH (Baruselli et al., 2008). En la figura 7 se muestra un esquema de un protocolo de superovulación después de tratamiento con estradiol y progesterona y uso de IATF.

Lewis & Trounson, (1996) realizaron un experimento a campo en la que se utilizaron un total de 58 animales en 6 establecimientos de Victoria (Australia). En este protocolo, los animales recibieron 2 inyecciones de PGF2 α cada 11 días. Seis días después de la última PGF2 α , las vacas recibieron un dispositivo intravaginal de progesterona CIDR-B (InterAg, Nueva Zelanda). A los 3 días de colocado el CIDR-B la mitad de las donantes recibieron una inyección intramuscular (IM) de 5 mg de E-17B mientras que la otra mitad de los animales no recibieron la inyección de E-17B. Todas las donantes fueron superestimuladas 7 días después de colocado el CIDR-B (o 4 días post E-17B). Los resultados muestran que los animales que recibieron E-17B tuvieron una tendencia (P=0,061) a producir un número mayor de embriones transferibles. Se demostró así, que el tratamiento de progestágeno más E-17B resulta en el crecimiento sincrónico de una nueva onda folicular, que comienza en promedio 4,3 días después. Utilizando este tratamiento es posible sincronizar el desarrollo folicular en un grupo de donantes, sin tener en cuenta el estadio del ciclo en que se encuentran. Los tratamientos comenzados en el momento del inicio de la nueva onda folicular (4 días pos E-17B) resultan en una respuesta comparable o superior a la de los tratamientos iniciados de la manera tradicional. Este procedimiento tiene la ventaja de poder elegir el momento para realizar la colección y facilita la programación de grupos de donantes en un determinado establecimiento (Bó & Mapletoft, 1999).

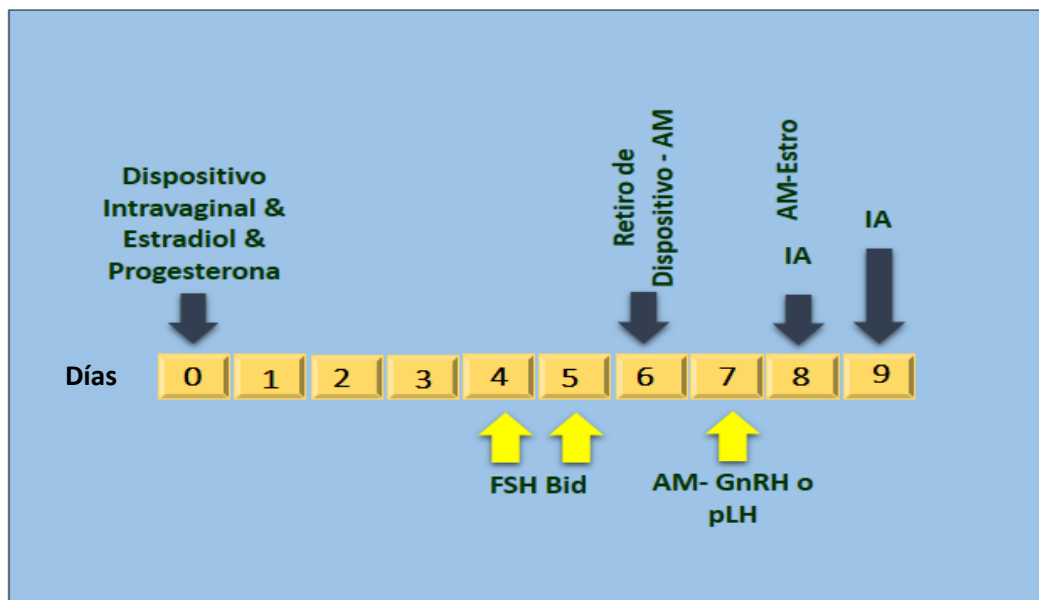


Figura 7. Esquema de un protocolo de superovulación después de tratamiento con estradiol y progesterona y uso de IATF

Los trabajos anteriormente descritos demuestran la efectividad en la utilización de tratamientos con E-17B y progestágenos en programas de superovulación. Sin embargo, Bó & Mapletoft, (1999) refieren que el mayor inconveniente es que el E-17B es que no se encuentra disponible como preparado comercial en el mercado argentino, y hay que prepararlo a partir de la droga pura estradiol E-8875 de Sigma Chemical Co., USA o de otra fuente comercial de esta droga pura. Como mencionado anteriormente, el uso de estradiol se encuentra restringido en países como USA, Nueva Zelanda y de la Unión Europea. Con esta restricción, se hizo necesario el desarrollo de tratamientos que no requieren el uso de ésteres de estradiol (Mapletoft et al., 2009).

2.5.1.2 Ablación Folicular

Una alternativa al uso del estradiol es eliminar el efecto supresor del folículo dominante a través de la aspiración folicular guiada por ultrasonografía y comenzar el tratamiento superestimulador 1 o 2 días después (Bungartz & Niemann, 1994; Bergfelt et al., 1997). La ablación del folículo dominante es generalmente conseguida usando un equipo de aspiración folicular guiado por ultrasonido. Puede realizarse la aspiración de todos los folículos mayores de 5 mm de diámetro o la ablación del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular, lo que ocasiona un descenso prematuro de los estrógenos e indirectamente de la FSH, y sincroniza la emergencia de una nueva onda de crecimiento. Para mejorar el desarrollo folicular este tratamiento puede ser acompañado por inyecciones de somatotropina bovina (Butarini 2000 et al., 2000). Los primeros trabajos de ablación folicular realizaban la extracción de todos los folículos ≥ 5 mm (Bergfelt et al., 1997), posteriormente se ha demostrado que solo es necesario la ablación de los dos folículos más grandes (Baracaldo et al., 2000) para asegurar que el folículo dominante sea eliminado (Baracaldo et al., 2000). Los tratamientos superestimuladores se pueden iniciar 1 a 2 días más tarde, en el momento de la emergencia de una nueva onda folicular. En la figura 8 se presenta un esquema de un protocolo con ablación folicular.

Bó & Mapletoft (1999) realizaron una serie de experimentos en base a estos resultados preliminares para evaluar la respuesta superovulatoria de la onda folicular sincronizada mediante la ablación. Las vaquillonas del grupo control (esquema tradicional) recibieron una dosis de PGF 2α (500 mcg cloprostenol) y fueron superestimuladas entre los días 8 a 12 después del celo. A las vaquillonas del grupo ablación se le realizó aspiración de todos los folículos > 5 mm presentes en el ovario y al mismo tiempo se colocó un implante de Norgestomet para controlar la fase luteal, iniciándose la superestimulación un día después.



Figura 8. Esquema de un protocolo de superestimulación luego de ablación folicular

Estos animales recibieron una sola inyección subcutánea (SC) detrás de la paleta de Folltropin-V (400 mg NIH-FSH-Pl), y se administró PGF a las 48 y 60 h de la inyección de Folltropin-V y se inseminaron (IA) 60 y 72 h después de la primera aplicación de PGF. Los embriones fueron colectados 7 días después de la primera IA. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre los grupos, pero que las respuestas de las vaquillonas en el grupo ablación fueron significativamente menos variables que las del grupo control. Se debe mencionar que la ablación folicular fue realizada en cualquier momento del ciclo, por lo tanto, utilizando este procedimiento no es necesario sincronizar a las donantes antes de empezar un programa de superovulación, lo que representa una ventaja en relación a protocolos anteriores.

La aspiración folicular también ha sido realizada en otros laboratorios con esquemas más rígidos en relación al ciclo estral. Como ejemplo se puede mencionar un estudio en donde la aspiración del folículo dominante se realizó el día 6, o 7 u 8 del ciclo (2 días antes de comenzar la superestimulación). En este caso se obtuvo en una respuesta significativamente mayor que la de vacas superestimuladas en el mismo período del ciclo estral, pero que conservaban el folículo dominante (Bó & Mapletoft, 1999). Aunque el tratamiento de ablación folicular ha resultado ser muy eficaz, su desventaja reside en el hecho de ser siempre necesario contar con un equipo de ultrasonido y personal capacitado, estos dos aspectos se consiguen fácilmente en centros de

producción de embriones, pero que resultan difíciles de conseguir y aplicar a campo, (Bó et al., 2006).

2.5.1.3 GnRH o pLH

Según Macmillan & Thatcher (1991) la GnRH induce ovulación o luteinización del folículo más grande en el momento del tratamiento, con emergencia de una nueva onda folicular aproximadamente 2 días después. Por otro lado, se demostró que la emergencia de la onda folicular sólo ocurre cuando el tratamiento resultó en ovulación (Martinez et al., 1999) y los porcentajes de ovulación después del tratamiento con GnRH en cualquier momento del ciclo estral varía entre 44,3% (Colazo et al., 2009) y 85% (Pursley et al., 1995). Por lo tanto, el intervalo desde el tratamiento con GnRH y la emergencia de la onda no es consistente como se requiere para la superestimulación. De hecho, Deyo et al. (2001) mostraron en sus trabajos una producción de embriones insatisfactoria después de la sincronización de la emergencia de la onda folicular para la superestimulación con GnRH. Resultados más recientes relacionados con trabajos comerciales (Steel & Hasler, 2009) y otro de investigación con 411 donantes lecheras (Wock et al., 2008) han tenido datos prometedores, sin diferencias significativas en producción de embriones comparativamente con el uso de un protocolo con estradiol. Básicamente el método consiste en la aplicación de un dispositivo con progesterona en cualquier momento del ciclo estral, se administra GnRH 2 o 3 días más tarde y se comienza el tratamiento superestimulador 1,5 a 2,5 días después (Carballo Guerrero et al., 2009).

Aunque se deben programar estudios experimentales controlados y apropiados para confirmar los resultados prometedores con el uso de GnRH, los profesionales han tenido éxito con el uso de esta hormona para sincronizar la emergencia de la onda folicular antes de la superovulación. Un esquema de un protocolo de la emergencia de la onda folicular con GnRH ó pLH, se presenta en la figura 9.

Otro protocolo eficaz (Figura 10) consiste en la aplicación de un dispositivo con progesterona y la administración de una dosis de PGF2 α en cualquier momento del ciclo estral (día 0). El dispositivo con progesterona no es removido y permanece hasta el momento en que finalizan los tratamientos con gonadotrofinas. La GnRH es administrada en el día 6, y los tratamientos con gonadotrofinas se inician 36 horas después (es decir, el día 8) en el momento esperado de la ovulación (Serrano, 2012, Small et al., 2009).

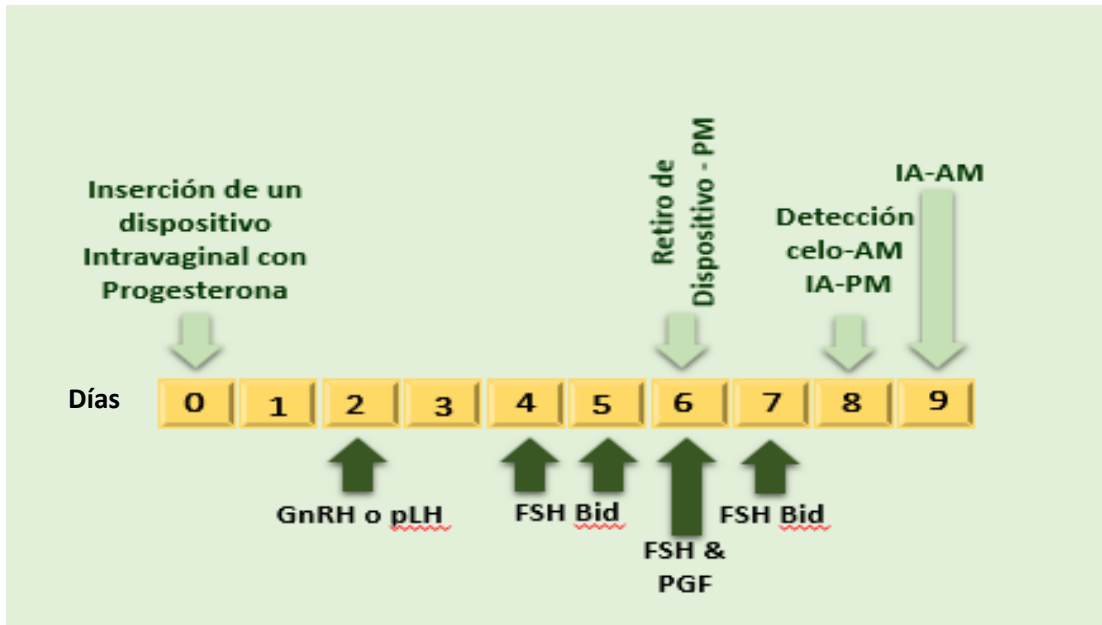


Figura 9. Esquema de un protocolo de superovulación después de sincronizar la emergencia de la onda folicular con GnRH ó pLH.

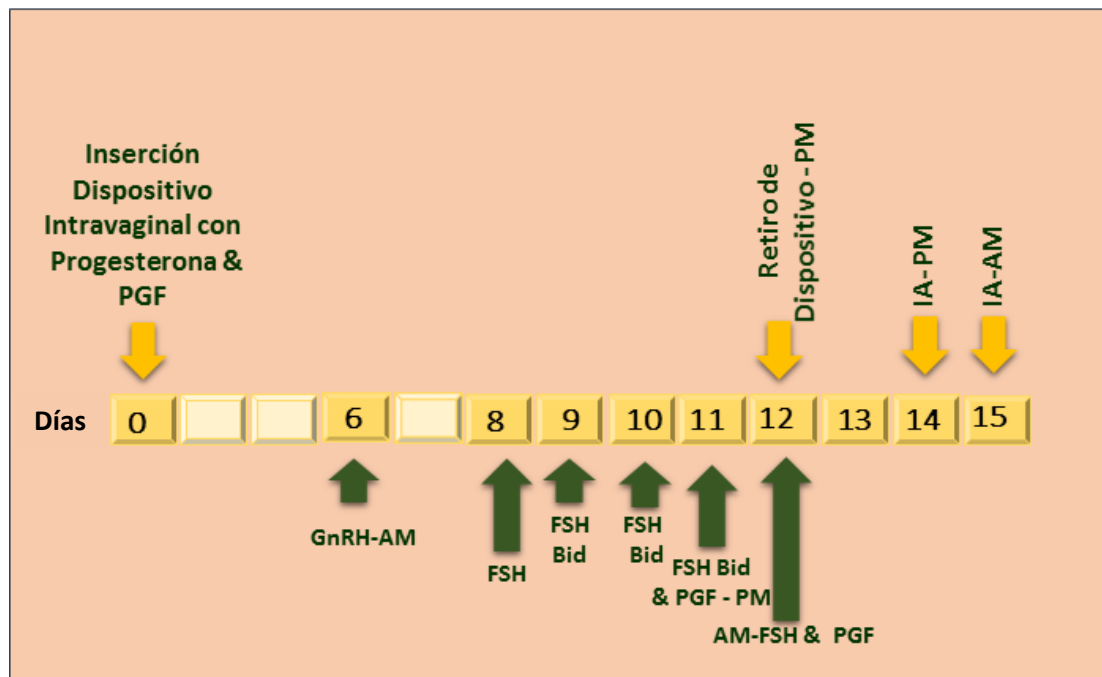


Figura 10. Sincronización de la emergencia de la onda folicular con GnRH

Mediante la adición de una segunda dosis de GnRH 24 horas después del retiro del dispositivo con progesterona (inicio esperado del estro), es posible realizar IA a tiempo fijo con este protocolo. En conjunto, los datos sugieren que los protocolos de superovulación en la primera onda folicular después de sincronizar la ovulación pueden ser utilizados sin la necesidad de detectar celos en grupos de donantes y sin disminuir la producción de embriones.

2.5.2 Inducción de la superovulación

2.5.2.1 Gonadotropinas

En vacas se han usado tres tipos diferentes de gonadotropinas para inducir superovulación: la hormona folículo estimulante (FSH), que puede ser oriunda del extracto de pituitaria de porcinos, ovinos y equinos, o incluso la FSH recombinante bovina y la somatotropina bovina (bST), la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la gonadotropina menopaúsica humana (hMG) (Machado et al., 2003; Marquez et al., 2008).

Cuando se iniciaron los protocolos de transferencia de embriones en bovinos, el tratamiento con eCG se hacía coincidir con la regresión natural del cuerpo lúteo (CL), es decir, el día 16 del ciclo (Serrano, 2012). Con la introducción de la prostaglandina F₂ α en la década del 70, fue posible iniciar los tratamientos con gonadotrofinas en otros momentos del ciclo estral. Así muchos profesionales veterinarios e investigadores modificaron el inicio de los tratamientos con gonadotrofinas a la mitad del ciclo (es decir, 8 a 12 días después del celo) (Bó et al., 1995; Mapletoft et al., 2002). Actualmente se sabe que en ese momento se inicia la emergencia de la segunda onda folicular en los bovinos que muestran dos o tres ondas por ciclo (Pierson and Ginther, 1987; Ginther et al., 1989).

Más tarde, se demostró que la respuesta superovulatoria era mayor cuando los tratamientos con gonadotrofinas se iniciaban en el preciso momento de la emergencia de la onda, en lugar de 1 o 2 días después (Nasser et al., 1993) siendo sin embargo necesario sincronizar el momento de emergencia de la onda folicular en grupos de animales.

Los tratamientos superovulatorios tradicionales, consistían en una sola administración de gonadotrofina coriónica equina (eCG o PMSG). La eCG es una glicoproteína compleja con actividad semejante a las hormonas folículo estimulante y luteinizante (FSH y LH, respectivamente).

La eCG es secretada por copas endometriales de las yeguas gestantes, entre los días 40 y 120 de gestación aproximadamente. Desde el punto de vista endocrinológico es importante resaltar dos valiosas características de la eCG que la distinguen de otras hormonas glicoproteicas, la primera es el hecho de poseer actividad FSH (folículo estimulante) y LH (luteinizante) cuando es administrada en especies distintas al equino, en donde sólo posee actividad LH y la segunda característica es su alto contenido en carbohidratos, hecho que le confiere características propias desde el punto de vista farmacocinético, como una vida media prolongada, que favorece su uso en una sola dosis a diferencia de la FSH cuya vida media es extremadamente corta y requiere aplicaciones múltiples (Sintex, 2005). Así, y de acuerdo con este artículo de Sintex la utilización de la eCG en veterinaria queda, pues, ampliamente fundamentada desde el punto de vista endocrinológico, justificándose su uso en todas aquellas situaciones donde se requiera la terapia con gonadotrofinas exógenas, particularmente cuando se requiere un efecto FSH, es decir el estímulo de la foliculogénesis en ovarios con actividad reducida o nula.

Según Murphy & Martinuk (1991) la eCG tiene una vida media de aproximadamente 2 días en la vaca y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea. En equinos, la eCG causa ovulación o la luteinización de los folículos durante la gestación, con el consecuente aumento de la progesterona circulante (Murphy y Martinuk, 1991). La eCG induce una respuesta inmunológica, produciendo anticuerpos anti-eCG, lo cual hace que su administración sea acompañada de suero anti-PMSG. Por otro lado, requiere el aumento de la dosis en aplicaciones subsecuentes para obtener el mismo efecto en los tratamientos posteriores. También es de referir que la estimulación prolongada con eCG provoca un aumento en el número de folículos anovulatorios al momento de la colección de embriones, afectando de esta forma la eficiencia de la colecta y la calidad de los embriones (González et al., 1994).

La eCG por un lado, permite obtener una respuesta superovulatoria con apenas una dosis, entre los días 8 y 12 del ciclo estral (recuérdese que posee una vida media en la sangre de más de diez días), prolongando la estimulación del crecimiento folicular, pero provocando un crecimiento disperso con altos niveles de estrógenos, lo que afectan tanto las tasas de fertilización como la calidad embrionaria, así como un aumento del tamaño de los ovarios y la formación de quistes lo que significa una desventaja en la aplicación de la misma (Goulding et al., 1996). A pesar del hecho de que la eCG tiene un menor costo en el mercado, su uso no está muy difundido, posiblemente por la asociación de estos efectos negativos descriptos arriba. En el punto 2.6.2.2 se describe un protocolo que utiliza esta hormona en las etapas finales de un tratamiento superovulatorio.

En la actualidad la mayoría de los tratamientos son efectuados con FSH debido a los mejores resultados obtenidos en la tasa de ovulación como en la calidad de los embriones que utilizando eCG. La inyección de FSH dos veces al día, en dosis decrecientes, promueve una mejor respuesta superovulatoria en ganado bovino que la eCG, aunque las múltiples inyecciones no llevan sólo a inconvenientes técnicos para el veterinario, sino que a su vez causan excesivo estrés en las hembras (Takedomi et al., 1995). Este tratamiento se realiza con la aplicación de dos dosis diarias, durante cuatro días, comenzando entre los días 8 y 12 del ciclo estral o dos administraciones diarias de extractos de pituitaria conteniendo FSH durante 4 o 5 días (Mapletoft et al., 2002).

Córdoba-Salinas (2011) explica que la vida media biológica de la FSH de origen pituitario es de 5 horas o menos, por eso debe ser inyectada vía intramuscular dos veces al día para inducir superovulación. Leyva et al. (1998) indican que uno de los principales problemas en el tratamiento superovulatorio con FSH ha sido el número de dosis a suministrar, pues la vida media de esta hormona es de aproximadamente unos 110 minutos (Fry et al., 1987). Por esto, y para obtener superovulación, resulta necesario el suministro repetido de la misma, manteniendo así, un nivel continuo en la sangre que garantice la acción de esta sobre los folículos ováricos. Dos aplicaciones diarias de FSH han resultado en una mayor respuesta superovulatoria que una sola aplicación diaria (Looney et al. 1981; Monniaux et al., 1983, Walsh et al., 1993). El inicio de la superovulación con FSH en la fase luteal, generalmente se efectúa entre los días 8 y 14 del ciclo, con resultados satisfactorios. Algunos autores refieren que el crecimiento folicular puede ser incrementado si en el día tres del ciclo se aplica una pequeña dosis de FSH pura, resultando en una mejor receptividad del ovario que cuando se aplica en la mitad del ciclo estral (Córdoba-Salinas, 2011).

En el ganado bovino no es posible aumentar el número de embriones transferibles con el simple aumento de la dosis de FSH, ya que con esta hormona la respuesta describe una meseta, y en ocasiones desciende cuando se administran dosis superiores de 32 mg, según comprobaron Donaldson & Ward (1986) El protocolo actualmente en uso es de dos veces al día por 4 o 5 días en dosis decrecientes. La PGF₂ α debe ser inyectada 48 o 72 horas después de iniciado el tratamiento, para inducir luteólisis.

Como ya mencionado, el uso de FSH como agente inductor de superovulación ha sido extensivamente estudiada. Por ejemplo, Gonzalez et al. (1994); Saunders et al. (1990); Hockley et al. (1992); Tríbulo et al. (1992); Donaldson, (1990, 1995) Braileanu (1998) probaron el uso de diferentes concentraciones, vías de administración, eficiencia de productos comerciales y procedencias, y variaciones en la relación FSH-LH.

Según Barros & Nogueira (2004) han demostrado que concentraciones elevadas de LH en una preparación de FSH tiene efectos negativos en la producción y en la calidad de embriones bovinos. El nivel máximo de LH debe ser de 15 a 20%. Los resultados inconstantes según Stock et al. (1996) citados por el mismo autor han sido asociados con las ovulaciones prematuras durante el tratamiento con FSH, con la consecuente formación precoz de cuerpo lúteo, que secreta niveles subluteales de progesterona en el periodo esperado de estro y, por tanto, la inhibición del pico pre-ovulatorio de LH y consecuentemente de ovulaciones (Figura 11).

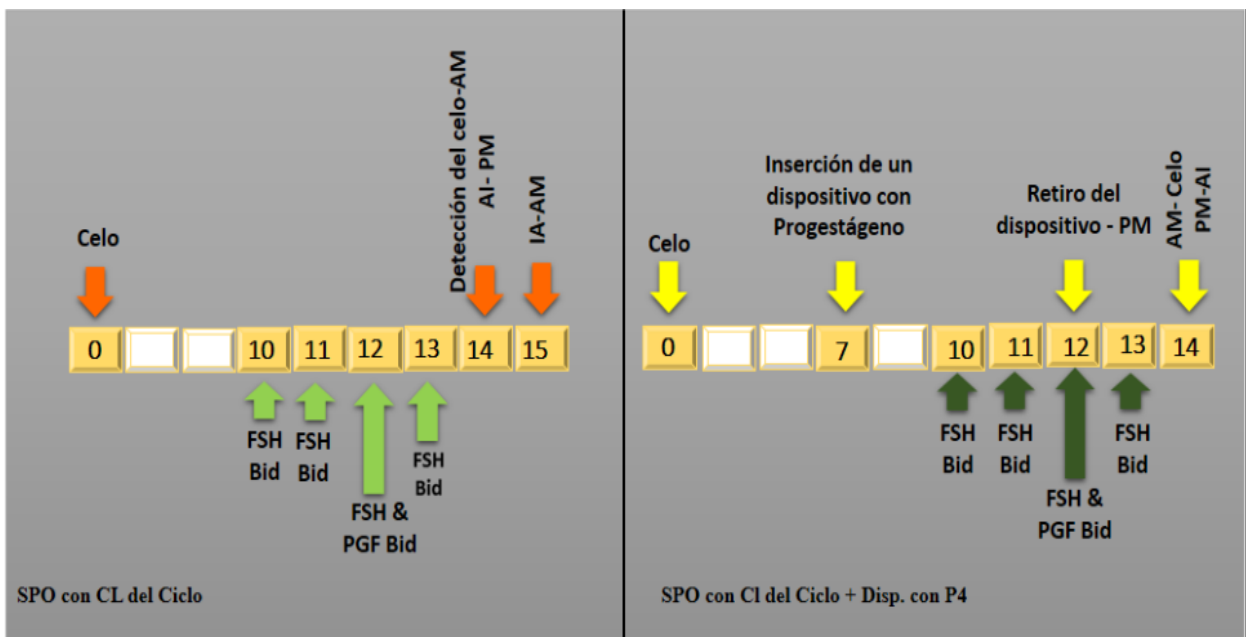


Figura 11. Esquema de dos protocolos con utilización de la FSH con CL del ciclo y CL más dispositivo intravaginal con P4.

2.5.2.2 FSH + eCG: Uso de eCG en las etapas finales del tratamiento superestimuladorio

Después de la selección, el folículo dominante adquiere receptores de LH y pasa a ser LH dependiente (Mihm y Evans, 2008), por lo tanto, los folículos de vacas superestimuladas se pueden beneficiar con una mayor cantidad de LH al final del tratamiento. La eCG es una gonadotrofina con actividad FSH y LH (Steward et al., 1976; Litch et al., 1979; Murphy & Martinuk, 1991) que puede proporcionar un estímulo constante para los receptores de LH de los folículos en crecimiento cerca del final de un protocolo de tratamiento superovulatorio convencional de FSH. Barros et al. (2008)

realizaron un experimento donde evaluaron la respuesta superovulatoria en vacas donantes Nelore que fueron superestimuladas con Folltropin-V durante los primeros tres días de tratamiento y a las cuales se les reemplazó las últimas dos inyecciones de FSH (correspondientes al cuarto día), por dos inyecciones de 200 UI de eCG. Las vacas donantes del grupo control, fueron superestimuladas con el tratamiento convencional de 8 dosis decrecientes de FSH cada 12h, por 4 días. De acuerdo con los resultados obtenidos, el tratamiento con eCG aumentó significativamente el número de ovocitos/embriones y aumentó el número de embriones transferibles. Sartori et al. 2009, sin embargo, no encontraron un efecto benéfico de la eCG en vaquillonas Nelore; pero los mismos autores encontraron más embriones transferibles en donantes de embriones de la raza Red Sindi (*Bos indicus*) (Sartori et al., 2011).

En la raza Brangus, el protocolo P-36/eCG mejoro la cantidad de embriones viables ($10,9 \pm 1,5$) cuando se comparó con el protocolo P36 ($7,1 \pm 1,4$) según trabajos de Reano et al. (2009). Resultados positivos fueron también obtenidos con la raza Red Sindi, donde los autores verificaron que la incorporación de eCG al protocolo P36 aumentaba el número de embriones viables ($5,8 \pm 1,3$ vs $2,6 \pm 0,7$; $p < 0,01$, Mattos et al. (2011). En la mayor parte de estos trabajos los tratamientos con dos dosis de eCG en el día 7 resultaron en un aumento en el número de embriones transferibles. En la figura 12 se puede ver un esquema de un protocolo de superovulación en el cual se reemplazan las inyecciones de FSH con dos inyecciones de 200 UI de eCG seguida de AITF.



Figura 12. Esquema de un protocolo de superovulación reemplazando las dos últimas inyecciones de FSH con dos inyecciones de 200 UI de eCG seguidas de AITF

2.5.2.3 Superovulación con una sola inyección de FSH subcutánea

Algunos trabajos hacen referencia a la aplicación única, subcutánea, de hormona FSH, diluida en solución salina (0,9% NaCl). Bó et al. (1994) y Lovie et al. (1994) observaron que la aplicación única presenta resultados similares a los de la aplicación múltiple (ocho inyecciones); mientras que Takedomi et al., (1995) no obtuvieron respuesta al realizar dicho protocolo.

Otros estudios han mostrado que la inyección única de FSH por vía subcutánea, sería suficiente para inducir superovulación en bovinos. Sin embargo, esta inyección aumenta las concentraciones plasmáticas de FSH durante un corto periodo, de forma que una parte de los folículos estimulados puede parar su crecimiento en la ausencia de niveles adecuados de FSH en la etapa final de la maduración (Martinez et al., 2008).

Kelly et al., 1997, analizaron los efectos de diferentes métodos de administración de hormona FSH y los resultados obtenidos por ellos, sugieren que la inyección única, por vía subcutánea, puede ser tan efectiva como las múltiples inyecciones intramusculares. Aunque la inyección única también provoca superovulación en las hembras bovinas, la administración de múltiples inyecciones de FSH produce una mayor cantidad de embriones congelables y transferibles comparativamente con la primera.

La necesidad de inyectar FSH dos veces por día no solo requiere una constante atención por parte del personal de los establecimientos, sino que además aumenta las posibilidades de cometer fallas por el mal manejo y errores en el momento de los tratamientos. También, dos aplicaciones diarias provocan necesariamente mayor estrés en las vacas donantes, disminuyendo generalmente la respuesta superovulatoria (Edwards et al., 1987; Bó et al., 1994) o alterando el pico preovulatorio de LH (Stoebel y Moberg, 1982). Por lo tanto, protocolos de superovulación simplificados pueden disminuir el costo de mano de obra y mejorar la respuesta, sobre todo en animales difíciles de tratar.

Una única inyección subcutánea (SC) de Folltropin-V de dosis equivalente a 400 mg NIH-FSH-P1 resulta en una respuesta superovulatoria que se asemeja a la de un régimen de tratamiento de dos aplicaciones diarias durante 4 días (Bó et al., 1994). Si bien esta respuesta parece estar dependiente de la condición corporal; una respuesta superovulatoria consistentemente más elevada se obtuvo cuando la inyección subcutánea se aplicó detrás de la escápula, que cuando se inyectó en la región del cuello. Otros trabajos muestran que la absorción de FSH ya sea por inyección intramuscular o inyección SC en la región del cuello en vacas flacas, no aumenta la respuesta superovulatoria, manteniendo la misma baja. Los resultados también fueron inconsistentes en vacas Holstein, debido

a que tienen menor cantidad de grasa subcutánea, pero esto pudo ser ultrapasado por una dosis total de Folltropin-V dividida. Así, el 75% de la dosis se administra por vía subcutánea detrás de la escápula al comienzo del tratamiento y el restante 25% se administra en el momento de la aplicación de la PGF, 48 horas más tarde (Lovie et al., 1994). Un esquema de un protocolo con una sola inyección de FSH por vía subcutánea se puede ver en la figura 13.

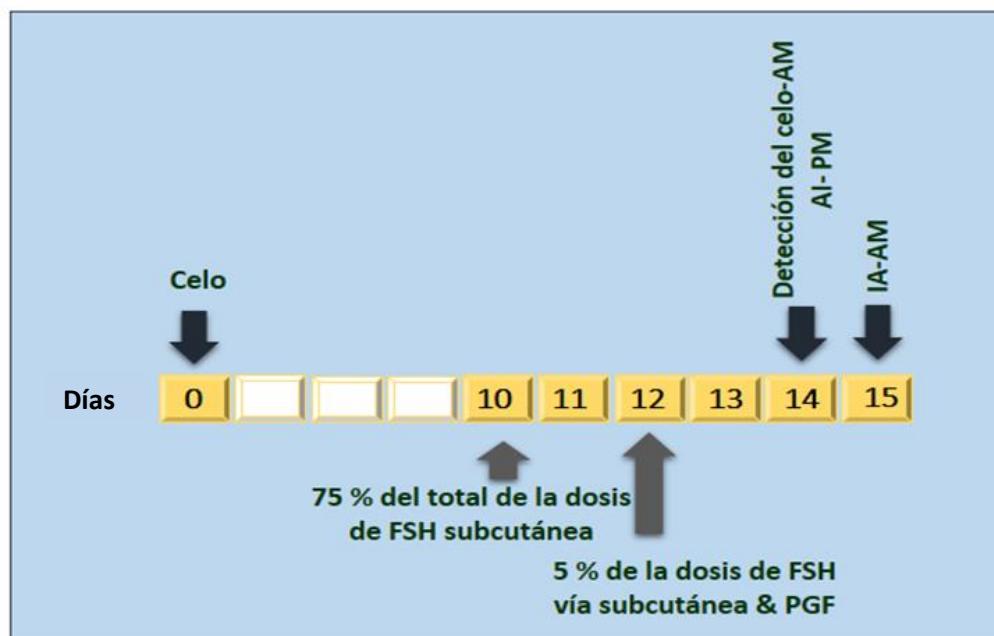


Figura 13. Esquema de un protocolo de superovulación con una sola inyección de FSH

Esta opción de una única inyección subcutánea, ha sido utilizada bajo diferentes circunstancias, pero resulta especialmente útil en animales nerviosos o no dóciles. Esta sola aplicación también es eficaz con protocolos de sincronización de la emergencia de la onda folicular y el uso de dispositivos con progesterona. Para asegurar la inyección en la grasa subcutánea, es necesario utilizar agujas de 0,5 pulgadas, fundamentalmente por si el animal se mueve durante la inyección. De todas formas, debe siempre asegurarse que la inyección se haga por vía subcutánea y en una almohadilla de grasa. Como resultado de esto, este protocolo no ha sido muy utilizado, especialmente en animales que presentan poca grasa subcutánea (Serrano, 2012).

2.5.2.4 Superovulación utilizando una única administración de FSH en una fórmula de liberación lenta

Una alternativa posible para inducir respuesta superovulatoria con una única inyección de FSH, es la combinación de extractos de pituitaria con agentes que liberen lenta y sostenidamente la hormona durante varios días. Los agentes usados son polímeros biodegradables que no reaccionan con el tejido, lo que facilita su uso en animales (Sutherland, 1991). Fueron varios los investigadores que usaron una única inyección de FSH en diferentes polímeros como la polivinilpirrolidona (PVP) como es el caso de Yamamoto et al. (1992) y Dattena et al. (1994), o el gel de hidróxido de aluminio (Kimura et al., 2016) y polietileno glicol (PEG) Choi et al. (2002). Sin embargo, existen en la bibliografía ejemplos de la imposibilidad de inducir una respuesta superovulatoria satisfactoria con PVP como es el caso de Callejas et al. (2002). Por otro lado, el hidróxido de aluminio es comúnmente utilizado como adyuvante en vacunas lo que puede impedir su uso para inducir superovulación (Baylor et al., 2002).

En los últimos años, se realizaron una serie de experimentos para determinar la respuesta superovulatoria en donantes tratadas con una única administración intramuscular de FSH diluida en un polímero de liberación lenta, el hialuronato. Los resultados de cinco experimentos con 325 colecciones de embriones revelaron que el promedio en el número de ovocitos/embriones, embriones fertilizado y embriones transferibles no difieren entre las vacas tratadas con una única administración intramuscular de FSH en hialuronato y aquellas vacas tratadas con dos aplicaciones intramusculares diarias de FSH (Tríbulo et al., 2011a). Sin embargo, en esos trabajos se habían usado 20 mg/ml de hialuronato lo que daba un aspecto viscoso y era difícil de mezclar con el Folltropin-V, especialmente en el campo. Una reducción del 50% en la concentración del hialuronato (10 mg/ml) resultó como era esperado en una solución menos viscosa y más fácil de mezclar con Folltropin-V, pero su aplicación en una sola inyección intramuscular resultó tener una menor respuesta superovulatoria, presumiblemente debido a una absorción más rápida que la obtenida con la dosis de hialuronato inicial. El tamaño medio de los folículos, en la experiencia referida, en el grupo 50% hialuronato (10mg/ml) fue idéntica al original de 100% de hialuronato (20mg/ml) y Folltropin-V en los días 4, 5 y 6, pero visiblemente menor en los días 7 y 8, y mayor en los días 10 y 11, lo que sugiere que varios folículos no alcanzaron un tamaño ovulatorio y no ovularon después del estro. Se especuló que una inyección adicional de Folltropin-V en la preparación 10 mg/ml (50%) 48 horas después de iniciar el tratamiento podría estimular los

folículos para continuar su crecimiento a un tamaño ovulatorio, como ocurrió en el grupo 100% hialuronato.

2.5.2.5 Superovulación con 2 inyecciones intramusculares de FSH en concentraciones reducidas de Hialuronato

En un estudio preliminar con 50 vacas de carne, dos inyecciones intramusculares de Folltropin-V en 50% de hialuronato (10 mg/ml) con 48 horas de diferencia (inyección dividida; 75% en el día 4 y 25% en el día 6) indujo una respuesta superovulatoria y un número de embriones que no se diferenciaron de los obtenidos con los tratamientos de 2 inyecciones diarias, durante 4 días. Por otro lado, el número de folículos de tamaño ovulatorio en el día de la inseminación, no fue diferente entre los grupos. Con estos resultados, se especuló que una preparación aún más diluida de hialuronato podría ser eficaz en un protocolo de dos inyecciones intramusculares (Serrano, 2013).

Tríbulo et al., (2011b) compararon el tratamiento de Folltropin-V diluido a 25% (5 mg/ml) o 50% (10 mg/ml) de hialuronato en solución salina en dos inyecciones intramusculares diarias, durante 4 días. Veintinueve vacas de carne (17 Angus y 12 Simmental) fueron asignadas aleatoriamente a uno de 3 tratamientos, Control 20 mg/ml (Trat. 1), 5 mg/ml hialuronato (Trat. 2) y 10 mg/ml hialuronato (Trat. 3) para ser superestimuladas 3 veces en un diseño experimental cruzado. Para las vacas del primer grupo, denominado grupo 1 o control se realizó la dilución de Folltropin-V con 20 ml de solución salina de hialuronato (control) o 10 ml de 5 mg/ml de hialuronato (MAP-5 50 mg, Bioniche Animal Health, Belleville, Canada) y 10 mg/ml de hialuronato (MAP-5) para las vacas de los grupos 2 y 3, respectivamente. Todas las vacas recibieron una dosis total de 300 mg Folltropin-V, dividido en inyecciones intramusculares 2 veces al día durante 4 días (control), o como una inyección intramuscular de 200 mg en el día 4 y 100 mg de Folltropin- V en el día 6 en 5 mg/ml (grupo 2) o 10 mg/ml (grupo 3) de hialuronato. El desarrollo folicular y la respuesta superovulatoria no difirieron entre los grupos, aunque el número de ovocitos/embriones y embriones fertilizados favorecieron a los grupos de dosis dividida (grupos 2 y 3). El número de embriones transferibles no difirió entre los grupos. Los datos recogidos permitieron verificar que el tratamiento de dosis dividida de Folltropin-V diluido en cualquiera de las soluciones de MAP-5 (5 mg/ml o 10 mg/ml) resulta en un número de embriones transferibles comparable al protocolo tradicional de 2 inyecciones intramusculares por día, durante cuatro días. La figura 14 muestra un protocolo de este tipo.

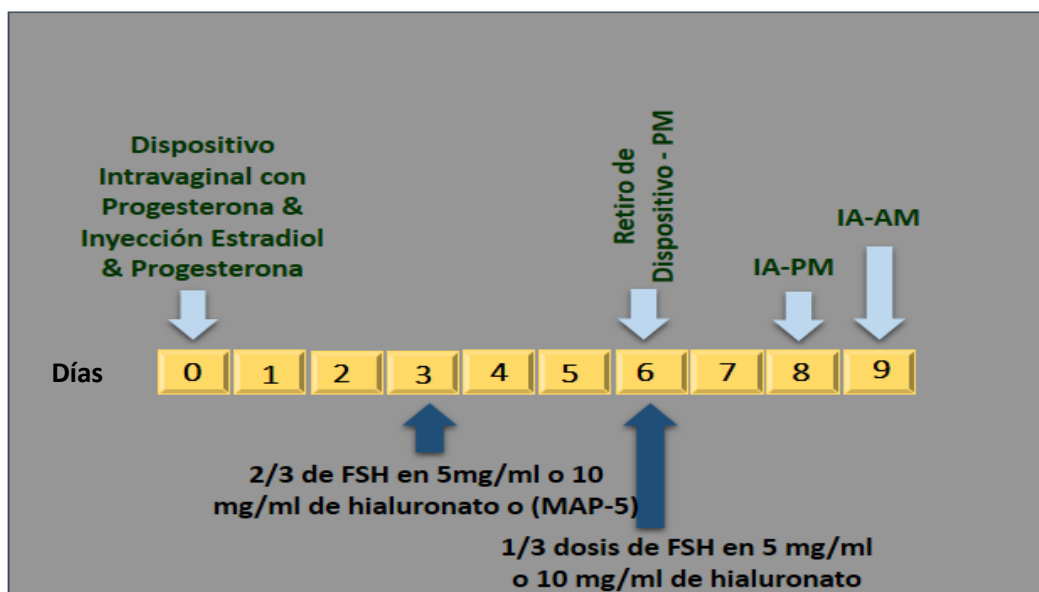


Figura 14. Esquema de un protocolo de superovulación en dosis divididas de FSH en 10 mg/ml o 5 mg/ml de hialuronato, seguida de la sincronización de la emergencia de la onda folicular y el uso de IATF.

2.5.2.6 Estimulación de los folículos subordinados

Durante la onda folicular normal, los folículos subordinados regresan debido a una disminución en las concentraciones de FSH, causada por las secreciones de estradiol e inhibina de la población folicular y especialmente por la secreción del folículo dominante (Adams et al., 1992; 1993). Los folículos pequeños, requieren FSH para continuar con su crecimiento, y se ha sugerido de acuerdo con las evidencias que los folículos tan pequeños como de 1 mm de diámetro comenzarían a crecer bajo la influencia de la FSH (Adams et al., 2008). Tal vez, todo lo que se necesite para la superovulación sea la presencia de folículos de 3 a 4 mm de diámetro en el momento que sea iniciado el protocolo tradicional de superestimulación durante 4 ó 5 días. Asumiendo una tasa de crecimiento de 1 a 2 mm por día, esto debería llevar de 2 a 3 días, o sea, sumar 2-3 días al protocolo de superestimulación. Bajo estas circunstancias, la presencia del folículo dominante puede no tener ningún efecto en la respuesta superovulatoria, la FSH exógena reemplaza a aquella que está siendo inhibida por las sustancias que secreta el folículo dominante. De hecho, Bó et al., (2008) superovuló con éxito donantes en cualquier momento del ciclo estral, sin tener en cuenta la presencia de un folículo dominante, utilizando el protocolo de la figura 15.

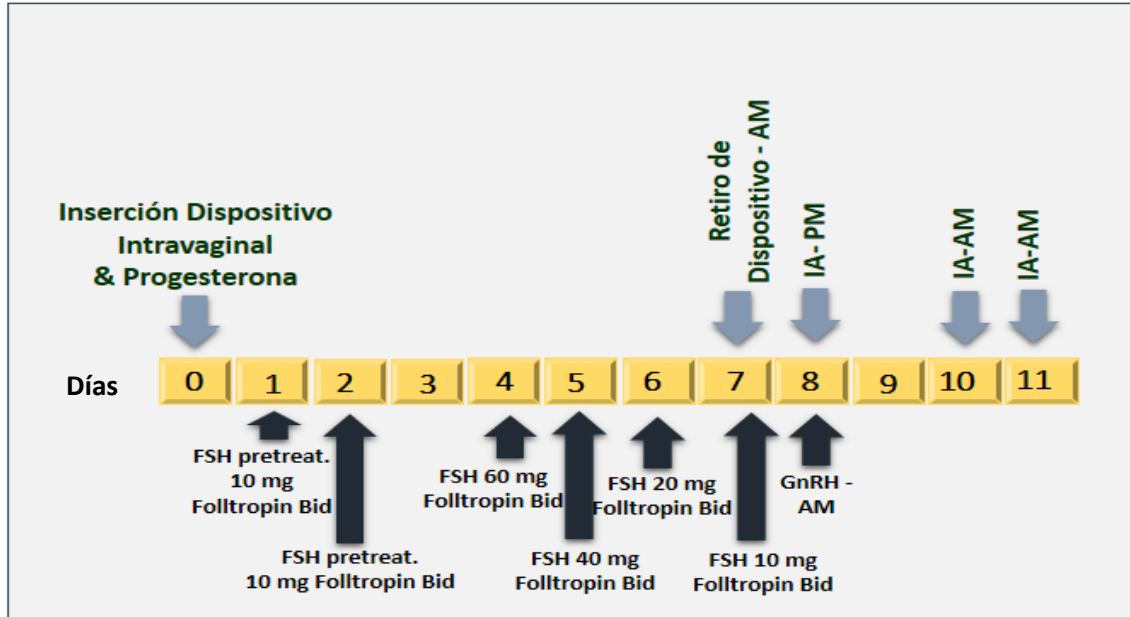


Figura 15. Esquema de un protocolo de superestimulación de los folículos subordinados

Por otra parte, los 2 días de pre tratamiento con FSH pueden ser reemplazados con una dosis de 500 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG) en el día 2. Caccia et al. (2000) demostraron que la administración de 500 UI de eCG, 2 días antes de iniciar los tratamientos con FSH, tiende a aumentar la respuesta superovulatoria.

Carballo Guerrero et al. (2007) han demostrado que el pre tratamiento con 500 UI de eCG, 2 días después de la emergencia de la onda folicular (en vacas con pobre respuesta), seguido por los tratamientos de FSH 2 días más tarde, aumenta la respuesta superovulatoria comparativamente con la respuesta obtenida cuando no se utilizó la eCG. Aunque no se ha estudiado estrictamente, se plantea con esto la hipótesis de que la eCG recluta folículos adicionales dentro de la onda.

Otras hormonas que pueden causar superovulación, aunque son poco utilizadas, son la EPE (extracto de pituitaria equina), FSH-o (extractos de pituitaria ovina) y HMG (gonadotrofina aislada de mujeres en menopausia) como lo citado anteriormente.

2.5.2.7 Superovulación de la primera onda folicular

La emergencia de la primera onda folicular surge el mismo día de la ovulación (o el día después del inicio del estro) en el ganado bovino (Ginther et al., 1989). Segundo Nasser et al. (1993) los tratamientos superovulatorios pueden ser iniciados en el momento de emergencia de la primera

onda folicular, y según Adams et al., los folículos de la primera onda folicular son tan sensibles como los de la segunda onda folicular. Sin embargo, un dispositivo con progesterona debe ser aplicado durante el tratamiento con gonadotrofinas en la primera onda folicular para asegurar una alta calidad embrionaria (Nasser et al., 2003; 2011). Fig. 16

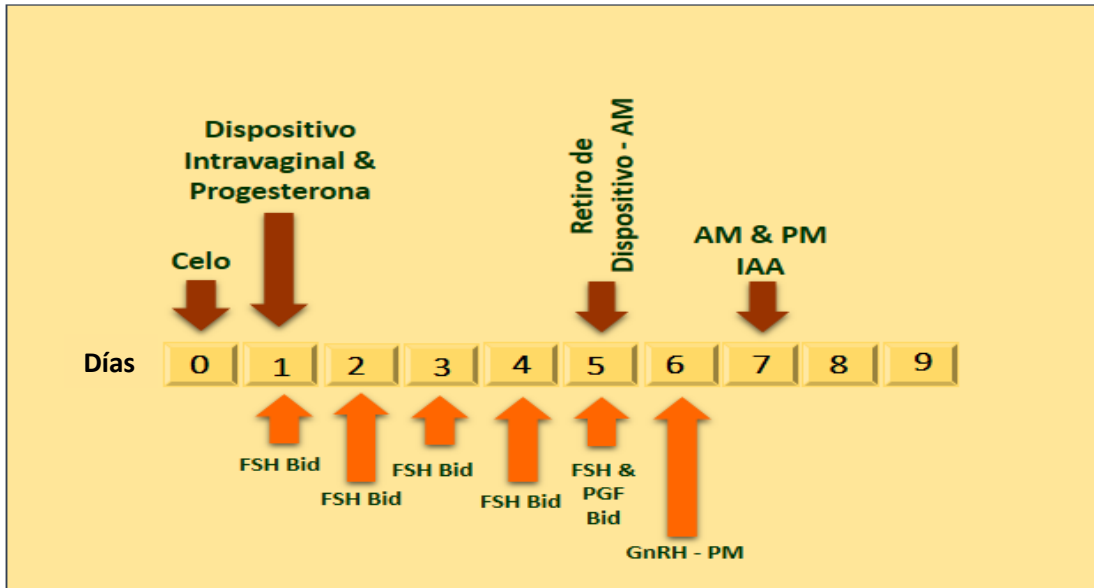


Figura 16. Esquema de un protocolo de superovulación en la primera onda folicular

2.5.2.8 Superovulaciones repetidas

Tradicionalmente la colecta de embriones de las vacas donantes se realizaba a intervalos de 60 días aproximadamente, pues se creía que estas hembras donantes necesitaban recuperarse de la superovulación, o de lo contrario la respuesta a la superovulación disminuiría. Sin embargo, la sincronización de la emergencia de la onda folicular permite la superovulación exitosa cada 25 a 35 días, sin tener en cuenta la expresión del celo (Mapletoft et al., 2002; 2009). Una vez que regresan los cuerpos lúteos (CL) múltiples y ocurre la ovulación, los patrones normales de la onda folicular se restablecen y la superovulación puede ser reprogramada. Esto es bastante fácil de realizar cuando el estradiol o la ablación folicular (o posiblemente la GnRH) son utilizadas para sincronizar la emergencia de la onda folicular; así una vez que las hembras donantes demuestran celo, el protocolo se reprograma. Pero también, es posible superovular donantes con intervalos de 30 días utilizando el protocolo de superestimulación de los folículos subordinados. El protocolo de tratamiento de

superovulaciones repetidas sin la necesidad de sincronizar la emergencia de la onda folicular se describe en la figura 17.

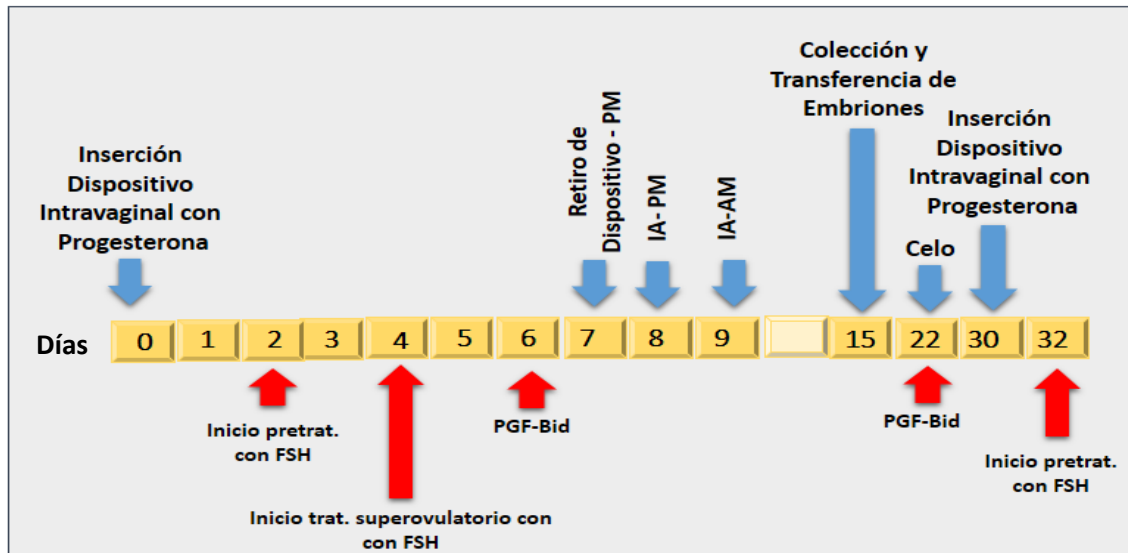


Figura 17. Esquema de un protocolo de superovulaciones repetidas sin sincronización de la emergencia de la onda folicular (Serrano, 2012)

La variabilidad en la producción de embriones viables por la donante sigue siendo el mayor problema de la transferencia de embriones. No obstante, las respuestas superovulatorias pueden aumentarse y la variabilidad disminuirse (no eliminarse) si se realizan los tratamientos con gonadotrofinas al comienzo de la onda folicular, antes de la selección del folículo dominante. Para comenzar los tratamientos superestimuladores en el inicio de la onda se pueden realizar ultrasonografías diarias o utilizar tratamientos que sincronicen el desarrollo folicular. Existen métodos mecánicos como la aspiración de todos los folículos > 5 mm presentes en el ovario (la superovulación debe iniciarse 1 o 2 días después) o tratamientos hormonales con progestágenos más estradiol. El intervalo entre el tratamiento y el inicio de la superovulación es de 4 días si utilizamos 5 mg de E-17B o 2,5 mg de EB combinados con 50 mg de P4 y de 5 o 6 días con 3 mg de norgestomet y 5 mg de EV. Para que el tratamiento con estradiol sea efectivo, se debe esperar un día para inyectar el estrógeno después de la colocación de un dispositivo progestágeno (CIDR-B o SMB) o administrar progesterona o progestágeno inyectable junto con el estradiol, en el momento que se coloca el implante. Además del control del desarrollo folicular se podría controlar la ovulación mediante la utilización del agonista de la GNRH deslorelina y la administración de LH

porcina. Tal vez lo más interesante de estos tratamientos es la posibilidad de independizarse del ciclo estral y poder programar grupos de donantes. Esto sin duda llevará a facilitar la aplicación de la técnica de transferencia de embriones y disminuirá los costos logísticos, ya que se puede elegir arbitrariamente el momento de la colección y armar circuitos, disminuyendo de esta manera los costos de movilidad de los profesionales.

2.5.3 Sincronización de la ovulación

2.5.3.1 GnRH o pLH

La sincronía de la ovulación también es uno de los problemas asociados a una pobre respuesta superovulatoria. Los tratamientos con análogos a la GnRH, o pLH permiten la utilización de IATF sin necesidad de detectar el celo y son beneficiosos cuando se utiliza en vacas que presentan folículos anovulatorios. Si bien la IATF de las donantes puede ser realizada con éxito, el intervalo óptimo entre la retirada del dispositivo y el tratamiento con GnRH difiere también entre razas (Bó & Mapletoft, 1999). Siendo por esto sugerido las siguientes alternativas:

a) para las donantes *Bos taurus*: remover el dispositivo con progesterona con la penúltima administración de FSH; aplicar GnRH o pLH 24 horas después y realizar la Inseminación artificial 12 a 24 horas después de la administración de la GnRH.

b) para donantes *Bos indicus*: remover el dispositivo de progesterona con la última aplicación de FSH, aplicar GnRH o pLH 24 horas después e inseminar 12 a 24 horas después de la aplicación de la GnRH.

c) para donantes productoras de leche *Bos taurus*: remover el dispositivo con progesterona con la última administración de FSH, dar GnRH o pLH 24 horas después, e inseminar 12 a 24 horas después de la administración de GnRH.

2.5.3.2. Deslorelina

Recientemente se han realizados experimentos tendientes a programar y sincronizar la ovulación de vaquillonas superestimuladas utilizando un agonista de la GnRH llamado deslorelina. De acuerdo con Bó y Mapletoft, 1999 los resultados de experimentos preliminares demostraron que, si se aplican en vaquillonas Brahman superestimuladas, dos implantes SC de deslorelina que liberan 50 g/día, se estimula la ovulación. Se comprobó, además, ser posible inducir la ovulación mediante

la administración exógena de LH porcina (Lutropin-V, Vetrepharm Canadá Inc.), que se produjo entre 24 y 40 h (media 32 h) pos inyección de LH.

Para evaluar la posibilidad de utilización de este protocolo en la sincronización de la ovulación de vaquillonas superestimuladas, Bó e Mapletoft, 1999, realizaron la siguiente experiencia. Se utilizaron 15 vaquillonas Brahman que fueron divididas en dos grupos. En el día 0 los animales del grupo control recibieron un implante de Crestar y los del otro grupo recibieron 2 implantes de deslorelina. A los 7 días se inició la superestimulación, inyectando PGF 48 h después y los Crestar fueron removidos 12 h más tarde. Los animales con deslorelina recibieron 25 mg de LH a las 60 h de la PGF y fueron inseminados a tiempo fijo 12 h después. Los animales del grupo control fueron inseminados en el momento del estro, 12 y 24 h después. Los resultados indican que el protocolo combinando, aplicando el agonista de GnRH más LH induce una ovulación sincrónica en vaquillonas permitiendo realizar una sola. Este protocolo plantea 2 alternativas prácticas interesantes: 1) la posibilidad de utilizar un tratamiento de este tipo cuando usamos semen congelado de muy alto valor y 2) la utilización de este protocolo en donantes *Bos indicus* donde el estrés podría afectar la respuesta superovulatoria, principalmente debido a alteraciones en la ovulación.

2.5.4 Nuevas tecnologías

Los avances de la Biología Molecular posiblemente nos llevaran al conocimiento de otros factores que influyen la dinámica de la onda folicular, y la identificación de genes que tengan efecto sobre la función folicular normal. Esto posiblemente permitirá influenciar la expresión génica o sus productos para aumentar el reclutamiento folicular y disminuir o posponer la atresia del folículo.

Finalmente, es de esperar que las gonadotropinas recombinantes provean a corto plazo de otra alternativa para la superestimulación del ganado. Los productos a base de gonadotropinas actualmente disponibles para su utilización en ganado bovino son todos producidos de la extracción y la purificación de hormonas producto de la función del tejido pituitario, de sangre o de orina. Considerando el riesgo potencial de la transmisión de patógenos derivados del uso de productos de origen animal como los mencionados, es previsible que las autoridades sanitarias exijan en el futuro que estos productos estén libres de derivados de animales, haciendo que sean reemplazados por productos recombinantes sintéticos aplicables a las tecnologías reproductivas. Las gonadotropinas

recombinantes posiblemente tengan una acción más prolongada, facilitando una forma de administración única. Estas hormonas están disponibles para su uso en clínicas de fertilidad humana; por lo tanto, es razonable esperar que, en un futuro no muy lejano, estas hormonas recombinantes con acción prolongada se usen en medicina veterinaria.

CONCLUSION

A lo largo de los últimos 40 a 50 años se han realizado innumerables proyectos de investigación y desarrollo con el objetivo de mejorar los protocolos de superestimulación en el ganado bovino. Los tratamientos han evolucionado desde aquellos primeros que dependían de la luteólisis natural hacia los tratamientos que controlan el desarrollo de los folículos y la ovulación. Estos avances han permitido que los tratamientos de superovulación sean más fáciles de usar, contribuyendo a una aplicación generalizada de la tecnología de la transferencia de embriones en todo el mundo. A pesar de que los nuevos conocimientos aplicados a los protocolos no han tenido el éxito esperado atribuido a la enorme variación individual en la respuesta superovulatoria, estudios más recientes han confirmado que la principal fuente de variabilidad es la población folicular en los ovarios de los animales donantes. Los tratamientos hormonales son usados preferentemente por la mayoría de los veterinarios debido a su practicidad y conveniencia. La superestimulación sincronizada de una cohorte de folículos puede ser lograda iniciando los tratamientos 4 días después de la aplicación de estradiol y progesterona, 2 días después de la ablación folicular, o 1.5 a 2 días después que la GnRH induzca la ovulación.

Respecto a los dispositivos con progesterona, en esta revisión se observó que son usados en casi todos los protocolos para mantener las concentraciones de progesterona superiores a 1ng/ml durante el tratamiento de superovulación y para controlar el momento de la ovulación. Si bien, estos protocolos han demostrado ser eficaces en la mayoría de razas de ganado bovino, las dosis recomendadas de FSH varían significativamente desde muy bajas para las razas de *Bos indicus*, a muy altas en alta en los donantes Holstein productoras de leche, a intermedias para las razas de *Bos taurus*.

Si bien, los conocimientos recientes no han resultado en un mayor número de embriones de una determinada donante, han dado herramientas para que las donantes seleccionadas tengan mayor probabilidad de responder satisfactoriamente a los tratamientos de superestimulación y por otro lado han proporcionado la oportunidad de valorar con mayor precisión las dosis de FSH. Estos nuevos conocimientos permiten además estudiar alternativas en aquellas donantes que no responden de forma satisfactoria a los tratamientos convencionales. Por ejemplo, La adición de eCG, 2 días antes de iniciar el tratamiento superovulatorio con FSH y/o extender el tratamiento de superestimulación con FSH a 6 o 7 días, pueden resultar muy útiles para aumentar el número de embriones transferibles en las vacas con una pobre respuesta.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G. P, Matteri R. L, Kastelic J. P., Ko, J. C. H. & Ginther, O. J. (1992) Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction Fertility*. 94, 177-188.
- Adams, G. P, Matteri, R. L. & Ginther, O. J. (1992) The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *Journal of Reproduction Fertility*. 95, 627- 640.
- Adams, G. P., Matteri, R. L. & Ginther, O. J. (1992). Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulation hormone in heifers. *Reproduction*. 96, 627-640.
- Adams, G. P., Kot, K. & Smith, C.A. et al. (1993) Effect of a dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Canadian Journal of Animal Science*. 73, 267-275.
- Adams, G. P. (1994) Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization and super stimulation. *Theriogenology*. 41, 19–24.
- Baracaldo, M. I., Martinez, M., Adams, G. P. & Mapletoft, R. J. (2000) Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, 53, 1239-1250.
- Barros, C. M. & Nogueira, M. F. G. (2001) Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 56, 1483-1496.
- Barros, C. & Nogueira, M. (2004) Superovulação em zebuínos de corte. En: *Biotecnologia da reprodução em bovinos*. I Simpósio Internacional da reprodução animal aplicada. Londrina, pr; 2004.
- Barros, C. M. & Nogueira, M. F. G. (2005) Superovulation in zebu cattle: Protocol P-36. *Embryo Transfer Newsletter*. 23, 5-9.
- Barros, C. M., Barcelos, A. C. Z., Gouvea, L. M., Meneghel, M., Barcelos, D. S., Barcelos, L. N., & Trinca, L.A. (2008) Improvement of a superovulatory protocol in nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reproduction Fertility and Development*. 20 (1), p. 152
- Baruselli, P. S., Madureira, E. H. & Marques, M. O. (2001) Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en *Bos indicus*. Primera parte. *Taurus*. 12, 15-25.
- Baruselli, P. S. Ayres, H., Sousa, A. H., Martins, C. M., Gimenes, L. U. & Torres-Júnior, J. R. S. (2006) Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. En: *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*. Londrina. *Anais Londrina*, p.103-136.

- Baruselli, P., Gimenes, L. & Sales, J. (2007) Fisiologia reproductiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31(2): 205-11.
- Baruselli, P., Martins, C., Sales, J. & Ferreira, R. (2008) Novos avanços na super ovulação de bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36 (2), 433-48.
- Baylor, N. W., Egan, W. & Richman, P. (2002) Aluminum salts in vaccines-US perspective. *Vaccine*. 20, 18–23.
- Beculaba, F. (2007) Factores que afectan la superovulación en bovinos. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embionario/17-superovulacion.pdf
- Bergfelt, D. R., Bo, G. A., Mapletoft, R. J. & Adams, G. P. (1997) Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Animal Reproduction Science*. 49, 1-12.
- Bó, G. A., Hockley, D. K., Nasser, L. F. & Mapletoft, R. J. (1994a) Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology*. 42 (6) 963-975
- Bó, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., Caccia, M., Tríbulo, H. & Mapletoft, R. J. (1994b). Follicular wave dynamics after estradiol 17- β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*. 41,1555-1569.
- Bó, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A. & Mapletoft, R. J. (1995) Exogenous control of follicular waves emergence in cattle. *Theriogenology*. 43, 32-40.
- Bó, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A. & Mapletoft, R. J. (1996) Effect of progestogen plus estradiol-17 β on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*. 45, 897-910.
- Bó, G. A. & Mapletoft, R. J. (1999) Control del desarrollo folicular y su aplicación en programas de superovulación de donantes de embriones. *Sitio Argentino de Producción Animal*. p 1-10. *Taurus*, 1(4), 14-27. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embionario/01-control.pdf
- Bó, G. A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo R, et al. (2002) The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57, 53–7.
- Bó, G. A., Moreno, D. Cuaita, L. & Caccia, M. (2003) Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones. IV Seminario Internacional de producción de grandes animales. CGR Bogotá, Colombia.
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Chesta, P. M. & Martins, C. M. (2006) The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*. 65,89-101.

- Bó, G. A., Tríbulo, A. & Mapletoft, R. J. (2011) Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones bovinos. *Spermova*. 1(1), 26-33. Disponible en <http://www.reproduccionanimal.org/site3/files/revistas/spermova1/NUEVOS-PROTOCOLOS-DE-SUPEROVULACION-PARA-BOVINObo2011-26-33.pdf>
- Bó, G.A., Carballo Guerrero, D. & Adams, G.P. (2008) Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*. 69: 81-87.
- Bó, G. A., Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Rogan, D. & Mapletoft, R. J. (2010) New approaches to superovulation in the cow. *Reproduction Fertility and Development*. 22, 106-112.
- Bó, G. A., Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R. & Mapletoft, R. J. (2011) Nuevos tratamientos hormonales para la superovulación de donantes de embriones bovinos. *Síto Argentino de Producción Animal*. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embionario/33-tratamientos_superovulacion.pdf
- Braileanu, G., Albanese, C., Card, C. & Chedrese, P. (1998) fsh bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology*. 49 (5): 1031-7.
- Barros, C. & Nogueira, M. (2004) Superovulação em zebuínos de corte. En: *Biotechnologia da reprodução em bovinos. Simpósio Internacional da reprodução animal aplicada*. Londrina. PR.
- Bungartz, L. & Niemann, H. (1994) Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *Journal of Reproduction Fertility*. 101 (3), 583-591
- Buratini, J., Price, C., Visintin, J. E. & Bó, G. (2000) Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*. 54(3), 421-31.
- Cabodevila, J. & Torquatri, S. (2001) Superovulação de Fêmeas bovinas. En: *Palma, G. A. Biotechnologia de la reproducción 1ª Ed. INTA, Argentina*, 79-108
- Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H. & Bó, G. A. (2000) Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology*. 53, p 495.
- Callejas, S. S., Alberio, R., Cabodevila, J. A., Dulout, E, Aller, J. & Teruel, M. (2002) Ovarian stimulation with FSH-P in single dose in polivinylpirrolidone or the combination of a reduced dose of FSH-P and eCG. *Revista Argentina de Producción Animal*. 22, 141-151.
- Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo, R., Balla, E., Tríbulo, H. & Chesta, P. (2007) Efecto de la aplicación de eCG dos días previos al inicio de la superstimulación en donantes de embriones

- con antecedentes de baja respuesta a los tratamientos tradicionales. Proceedings VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, June 29 to July 1, 2007, Córdoba, Argentina. pp.289
- Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo R., Tríbulo, H. & Bó, G.A. (2009). Superovulatory response in beef cattle treated during the first follicular wave following synchronization of ovulation with a progestin device and GnRH. *Reproduction Fertility and Development*. 21: 242-243.
- Chesta P., Tribulo L., Tribulo H., Balla E, Baruselli P. S. & Bó G. A. (2007) Effect of time of ovulation induction by gonadotropin-releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. *Reproduction Fertility and Development*. 307
- Córdoba- Salinas, A. B. (2011) Protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones bovinos. Tesis, Universidad de Cuenca, Ecuador. Disponible en <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3050/1/mv167.pdf>
- Curtis, J. L. (1991) *Cattle Embryo Transfer Procedure*. Academic Press, INC. Harcourt Brace Jovanovich, Publisher. Pp. 1
- Dattena, M., Vespignani, S., Branca, A., Gallus, M., Ledda, S., Naitana, S. & Cappai P. (1994) Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 42 (2), 235-239
- Demetrio, D. G. D., Santos, R. M., Demetrio, C. G. D. & Vasconcelos, J. L. M. (2007) Factors Affecting Conception Rates Following Artificial Insemination or Embryo Transfer in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*. 90 (11), 5073-5082
- Deyo, C. D, Colazo M. G., Martinez, M. F. & Mapletoft, R. J. (2001) The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. *Theriogenology*. 55, 513. Disponible en: <http://revivah.com.br/site/wp-content/uploads/2015/04/Bovinos-IATF-Efici%C3%Aancia-Reprodutiva-Baruselli-e-col..pdf>
- Donaldson, L. E. (1995) A comparison of fsh products. En: *International workshops of embryo transfer, biotechnology and advanced technologies*. Montevideo: Universidad de la República. 1; 1-8.
- Duica, A. A, Tovío, N. L. & Grajales, H. L. (2007) Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*. Universidad de Lasalle, Bogotá, Colombia. p 107-124. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/951/95101409.pdf>

- Eckery, D. C., Moeller, C. L., Nett, T. M. & Sawyer, H. R. (1994) Recombinant bovine somatotropin does not improve superovulatory response in sheep. *Journal of Animal Science*. 72:2425-2430
- Ereno, R. (2002) Dinâmica folicular em bovinos. Monografía de Maestría. Universidad Estatal Paulista. Botucatu. São Paulo.
- FAO. (2010) La situación de los recursos zogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm> (traducción de la versión original en inglés, 2007)
- Fernandez Tubino A. (2003) Dinámica folicular: funcionamiento y regulación. Sitio Argentino de Producción Animal. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23-ondas_foliculares.pdf
- Fry, R.C., Cahill, L.P., Cummins, J.T., Bindon, B.M., Piper, L.R. & Clarke, I.J. (1987) The half-life of follicle-stimulating hormone in ovary intact and ovariectomized Booroola and control Merino ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 81:611–615
- Garzón, N, Urrego, R. & Giraldo, C. A. (2007) Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *Revista CES / Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Disponible en <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/viewFile/381/1883>
- Genzebu D. (2015) A Review of Embryo Transfer Technology in Cattle. *Global Journal of Animal Scientific Research*. 3(2), 562-575.
- Genzebu, D., Tamir, B. & Berhane, G. (2015) Study of reproductive and production performance of cross breed dairy cattle under smallholders management system in Bishoftu and Akaki Towns. *International Journal of Advanced Research in Biological Science*. 3(2), 118-123 118.
- Ginther, O. J., Kastelic, J. P. & Knopf, L. (1989) Composition of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science*. 20, 187-200.
- Ginther, O.J.; Wiltbank, M.C.; Fricke, P.M. et al. (1996) Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*. 55 (6), 1187-1194.
- Gomez, C. (2005) Transferencia de embriones experiencias en Colombia. Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. INTERVET. Bogotá. Colombia.
- Gonzalez, C. I. M., Machado, R., Simplicio, A. A. & Cunha, M. G. G. (1994) Ovulation and follicular development in goats after intravaginal progestogen PGF_{2a}-hCG treatment. *Revista Latinoamericana de Pequeños Rumiantes*. 1(2), 102-110.
- González-Stagnaro C. (2001) Reproducción bovina. Fundación Girarz. Venezuela. ISBN 980-296-826-0.

- Gonzalez, A., Lussier, J., Carruthers, T., Murphy, B.D. & Mapletoft, R. (1994) Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and anti pregnant mare serum gonadotropin. *Canadian Veterinary Journal*. 35(3): 158-62.
- Gong, J. G., Bramley, T. & Webb, R. (1991) The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biology of Reproduction*. 45:941-949.
- Gordon, I. (1999) Reproducción controlada de ganado vacuno y búfalos. España. Ed. Acribia.
- Goulding, D., Williams, D. H., Roche, J. F. & Boland, M. P. (1996) Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG. *Theriogenology*, 45,765-773.
- Grasso, F, Guilbault, L. A, Roy, G. L. & Lussier, J. G. (1989) Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology*. 31, 1209–1220.
- Guilbault, L. A., Grasso, F., Lussier, J.G., Matton, P. & Rouillier, P. (1991) Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in presence of a dominant follicle. *Journal of Reproduction Fertility*. 91, 81–89.
- Ginther, O. J., Knopf, L. & Kastelic, J. P. (1989) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*. 87, 223-230
- Hafez, E. S. E., Jainudeen, M. R. & Rosnina, Y. (2000) Hormones, growth factors, and reproduction. En: Hafez, E. S. E., Hafez, B. *Reproduction in farm animals*. 7 Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2000. 509pp. Chap. 3, p 33-54.
- Hasler, J.F. (1991). Current status and potential of reproductive technology, *J. Dairy Science*, Pp. 197.
- Hasler, J. F. (1992) Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 75, 2857–2879.
- Hasler, J. F. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56:1401-1415.
- Henaó, G. R (2010) Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en *Bos indicus*. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embionario/17-superovulacion.pdf
- Hockley, D., Bó, G., Palasz, A., Del Campo, M. & Mapletoft, R. (1992) Superovulation with a single subcutaneous injection of Follitropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology*. 37: 224.

- Huertas, I. & Huertas, V. (1991) Manual práctico y moderno de inseminación artificial. Transferencia de embriones. Reproducir LTDA.
- Huhtinen, M, Raino, V, Alto, J. & Bredbacka, P. (1992) Increased ovarian responses in the absence of the dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*. 37, 457–463.
- Iñiguez, F. (2011) Manipulación del ciclo estral del ganado bovino. Virbac al día. n° 23. México. Disponible en <http://www.webveterinaria.com/virbac/news23/bovinos.pdf>
- Intervet. (2007) Compendio de Producción Animal. Sinervia S.A. Uruguay/ Sinervia S.A. Paraguay. Monika Ptaszynska, editora de la 9ª edición. Juan Jose Molina, co-editor de la versión Latino Americana
- Jiménez, C. (2005) Congreso internacional de reproducción bovina. Enfermedades transmivibles por transferencia de embriones. INTERVET. Bogotá. Colombia.
- Kaiser, W. V., Ávila, F. C., Munchen, G., Copetti, G., Garlet, R. & Araldi, D. F. (2015) Diferenças entre Taurinos e Zebuínos quanto a fisiologia da reprodução. Revisão Bibliográfica. XX Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão. Disponible en <https://www.unicruz.edu.br/seminario/anais/XX/Graduacao/Graduacao%20-%20Resumo%20Expandido%20-%20Exatas,%20Agrarias%20e%20Ambientais/DIFERENCAS%20ENTRE%20TAURINOS%20E%20ZEBUINOS%20QUANTO%20A%20FISIOLOGIA>
- Kimura, K. (2016) Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 62(5), 423–429.
- Knights, M., Q. S. Baptiste, A. B. Dixon, J. L. Pate, D. J. Marsh, E. K. Inskeep, & Lewis P. E. (2003) Effects of dosage of FSH, vehicle and time of treatment on ovulation rate and prolificacy in ewes during the anestrous season. *Small Ruminant Research*. 50,1–9
- Lamb, C. (2005) Factors affecting pregnancy rates in an IVF embryo transfer program. Joint. Proceedings of the AETA and the CETA. pp 31-36.
- Lane, E. A., Austin, E. J. & Crowe, M. A. (2008) Estrus synchronisation in cattle. Current options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals; A review. *Animal Reproduction Science*. v109, p.1-16
- Lewis, L. M. & Trounson, A. O. (1996) Superovulation in catchchemical ablation of the dominant follicle using estradiol-17B. *Singapore Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 27(1):63-65.
- Leyva, V., Buckrell, B. C. & Walton, J. S. (1998) Regulation of follicular and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*. 50, 395-416

- Licht, P., Gallo, A. B., Aggarwal, B. B., Farmer, S. W., Castelino, J. B. & Papkoff, H. (1979) Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. *Journal of Endocrinology*. 83, 311–322
- Looney, C. R., Boutle, B. W., Archibald, L. F. & Godke, R. A. (1981) Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology* 15: 13-22.
- Lovie, M., García, A., Hackett, A. & Mapletoft, R. J. (1994). The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to fooltrophin in holstein cows. *Theriogenology*. 41, p. 241.
- Machado, L. F., Corrêa, M. & Pineschi, L. E. (2003) Alternativas hormonais para programas de transferência de embriões em bovinos. Disponível em: www.ufpel.tche.br/hcv
- Macmillan, K. & Thatcher, W. (1991) Effect of an antagonist gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biology of Reproduction*. 45, 883-889
- Mapletoft, R.J. (1985). Embryo transfer in the cow: general procedures. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 4, 843-858.
- Mapletoft, R. J., Steward, K. B. & Adams, G. P. (2002) Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutritional Development*. 42(6), 601-11.
- Mapletoft, R. J., Bó, G. A. & Adams, G. P. (2007) Superovulation in the cow: Effects of Gonadotrophins and Follicular Wave Status. *Reproduction Fertility and Development*. 52, S7-S18.
- Mapletoft, R. J., Bó, G. A. & Baruselli, P. S. (2009) Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. *Animal Reproduction*. 6(1), 114-124
- Marques, M. O., Barreiros, T. R. R., Max, M. C., Silva, K. C. F., Gomes, R. G. & Seneda, M.M. (2008) IATF: desafios e soluções para maximizar a eficiência da técnica. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36 (2), 155-160.
- Martinelli Curry, J., R. L. (2012) Eficiência do protocolo superestimulatório P36 associado à administração de eCG ou LH, em animais de raça Nelore. Trabajo para obtención del grado de Master del Instituto de Biociências Botucatu, Universidade Estadual paulista- UNESP Disponível em http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/farmacologia_me_2012_jose_cury.pdf
- Martinez, M. F., Adams, G. P., Bergfelt, D., Kastelic, J. P. & Mapletoft, R. J. (1999) Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Animal Reproduction Science*. 57,23-33.
- Martinez, A., Alvarez, R., Pires, R. & Nogueira, G. (2008) Resposta ovariana e perfil de desenvolvimento folicular de novilhas tratadas com injeção subcutânea de fsh e reforço intramuscular após 48 horas. *Boletim de Indústria Animal*. 65(1): 15-19.

- Martins, C. M., Santos, I. C. C., Valentim, R., Sales, J. N. S, Reis, P. O, Crepaldi, G. A., Baruselli, O. S. & D'Occhio, M. J. (2008) Efeito da redução do número de administrações de fsh na resposta superovulatória e na produção de embriões de doadoras nelore. *Acta Scientiae Veterinariae*. s.d.
- Mayer, N., Ashworth, G. & Rodriguez, N. (2004) Aportes de la fisiología a la producción animal. Universidad Nacional de Rio Cuarto. 105p.
- Maziero, R. R. D., Mattos, M. C. C., Martin, I., Oba, E., Sartori, R. & Ferreira, J. C. P. (2007) Concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35 (3), p1034.
- Mihm, M., & Evans, A. C. O. (2008) Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: A comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reproduction in Domestic Animals*. 43, 48-56
- Mogollón-Waltero, E. M. & Burla-Dias, A. J. (2013) Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus*. 9(18), 37-47. Disponible en [file:///C:/Users/28102015/Downloads/545-1121-1-SM%20\(7\).pdf](file:///C:/Users/28102015/Downloads/545-1121-1-SM%20(7).pdf)
- [Monniaux, D., Chupin, D. & Saumande, J. \(1983\) Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*. 19, 55-81.](#)
- Monnlaux, D., Chupin, D. & Saumande, J. (1983) Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*. 19: 55-79.
- Murphy, B. D. & Martinuk, S. D. (1991) Equine chorionic gonadotropin. *Endocrinology Reviews*. 12, 27-44.
- Nasser, L. E, Bó, G. A., Reis, E. L., Menegati, J. A., Marques, M. O., Mapletoft, R. J., & Baruselli, P.S. (2003). Superovulatory response during the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 59, 530
- Nasser, L. F., Sá Filho, M. F., Reis, E. L., Rezende, C. R., Mapletoft, R. J., Bó, G. A. & Baruselli, P. S. (2011) Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 76 (2), 320-327
- Nasser, L., Adams, G. P., Bo, G. A. & Mapletoft, R. J. (1993) Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers, *Theriogenology*. 40, 713-724.
- Nogueira, M. F. G & Barros, C. M. (2003) Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P-36 protocol. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31, p. 509
- Palma, G. A. (2001) *Biología de la Reproducción*. Ediciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. 695pp.

- Palma, G. & Bream, G. (1993) Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina
- Pierson, R. A. & Ginther, O. J. (1987) Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day. *Animal Reproduction Science*. 14 (3), 165-176. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(87\)90080-7](https://doi.org/10.1016/0378-4320(87)90080-7)
- Pursley, J. R., Mee, M. O. & Wiltbank, M. C. (1995) Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology*. 44 (7), 915- 923.
- Pursley, J. R., Kosorok, M. R. & Wiltbank, M. C. (1995) Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *Journal of Dairy Science*. 80 (2), 301-306
- Reano, I., Carballo, D., Tríbulo, A. Tríbulo, P., Balla, E. & Bó, G. A. (2009) Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Follitropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. VIII Simposio internacional de reproducción animal – IRAC. 1, p.54.
- Rincker, C.E. (2013) Drafting embryo transfer contracts for cattle producers. Texas Agriculture Law Conference, Lubbock. Texas. Disponible en <https://pt.slideshare.net/rinckerlaw/drafting-embryo-transfer-contracts-for-livestock-producers>
- Rodriguez Aguilar, S., Vater, A. & Von Saldern, M. (2011) Efecto de la dosis de GnRH sobre el porcentaje de preñez en vaquillonas tratadas con progesterona y CPE. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC. Córdoba, Argentina. Disponible en http://www.iracbiogen.com.ar/admin/biblioteca/documentos/resumen_simposio_2011.pdf
- Ruiz, A. J. (2016) La fisiología del ciclo estral bovino. Disponible en: <https://www.genbiogan.com/single-post/2016/09/05/La-fisiolog%C3%ADa-del-ciclo-estral-bovino>
- Salgado, O. R., Mejia A. A. & Suarez S. P. (2011) Eficiencia de la respuesta superovulatoria del ganado Brahman al protocolo P-24. *Rev. MVZ Cordoba* 16, n.2, pp.2521-2527. ISSN 0122-0268.
- Sartori, R. & Barros, C. M. (2011) Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*. 124 (3-4), 244-50
- Saunders, J., Wilmott, N., Palasz, A. & Mapletoft, R. (1990) Dose titration of follitropin in the cow. *Theriogenology*. 33: 319.
- Selk, G. (2013). Embryo Transfer in Cattle DASNR 102 Agriculture Hall, Oklahoma State University Stillwater, OK 74078, ANSI-3158, <http://osufacts.okstate.edu>
- Serrano, J. (2012) Evolución de los tratamientos de superovulación. Disponible en <http://jairoserrano.com/2012/08/evolucion-de-los-tratamientos-de-superovulacion/>
- Sintex, 2005 <http://www.produccion-animal.com.ar/>

- Small, G. A., Colazo, M. G., Kastelic, J. P. & Mapletoft, R. J. (2009) Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology*. 71, 698–706. . doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.045. Epub 2008 Nov 1.
- Spell, A. R., Beal, W. E., Corah, L. R. & Lamb, G. C. (2001) Evaluating recipients and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 56, 287-297.
- Steel, R. G. & Hasler, J. F. (2009) Comparison of three different protocols for superstimulation of dairy cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 21, p. 246.
- Steward, F., Allen, W. R. & Moor, R. M. (1976) Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *Journal of Endocrinology*, 1 (71), 371-382
- Stoebel, D. & Moberg, G. (1982) Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 65(1), 92-6.
- Stringfellow, D. A. & Givens, M. D. (2000a) Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. *Animal Reproduction Science*. 60-61, 629-642.
- Stringfellow, D. A. & Givens, M. D. (2000b) Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. *Theriogenology*. 53, 85-94.
- Sutherland, W. (1991) Biomaterials – Novel material from biological sources. Ed. by Byrom, D. Published by Stockton Press, pp. 307-333
- Takedomi, T., Aogayi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G. & Sasamoto, S. (1995) Superovulation in Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinilpirrolidone. *Theriogenology*. 43, 1259-1268
- Torres-Júnior, J. R. S., Pires, M. F. A., Sá, W. F., Ferreira, A. M., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. A. et al. (2007) Efeito do estresse calórico na ciclicidade ovariana de doadoras *Bos indicus* sob regime de opu-piv. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35, Suppl 3.
- Tribulo, H., Jofre, F., Carcedo, J., Alonso, A., Tribulo, R. & Bó, G. (1993) Superovulation in *Bos indicus* with a single subcutaneous injection of comercial pituitary extracts. *Theriogenology*. 39: 331.
- Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Carballo, D., Tríbulo, P., Rogan, D., Mapletoft, R. J. & Bó, G. A. 2010. Superstimulation of Angus donors with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Reproduction Fertility and Development*. 22, 367pp.
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Alasino, R. V., Beltramo, D. et al, (2011a) Superstimulation in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Animal Reproduction Science*. 129, 7–13.

- Tríbulo, A. Rogan, D. Tríbulo, H., Tríbulo, R., Mapletoft, R. J. & Bó, G. A. (2011b) Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two different concentration of hyaluronan. *Theriogenology*. 7, 1679-1685
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Mapletoft, R. & Bó, G. A (2012) Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*. 77 (8), 1679 – 1685
- Tríbulo, A (2015) Superovulación de vacas donantes de embriones. Tesis. Universidad Nacional de Córdoba. Disponible en:
<https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1815/1%20Tr%C3%ADbulo%20-%20Car%C3%A1tula.pdf?sequence=1>
- Vasconcelos, J. L., Sartori, R., Oliveira, H. N., Guenther, J. G. & Wiltbank, M. C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*. 56, 307–314.
- Veiga, P., Chayer, R., Uslenghi, G. Montiel, J. & Callejas, S. (2011) Efecto de utilizar dispositivos intravaginales con progesterona combinados con cipionato o benzoato de estradiol para sincronizar la ovulación sobre el porcentaje de preñez a la IATF en vaquillonas Angus. IX Simpósio Internacional de Reproducción Animal, IRAC. Córdoba, Argentina. Disponible en http://www.iracbiogen.com.ar/admin/biblioteca/documentos/resumen_simposio_2011.pdf
- Velazquez M. A. (2008) The role of nutritional supplementation on the outcome of superovulation in cattle. *Animal Reproduction Science*. 126(1-2),1-10. •
- Wock, J. M., Lyle, L. M. & Hockett, M.E. 2008. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradio1-17P at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reproduction Fertility and Development*. 20, 228 (abstract).
- Wolfenson, D., Thatcher, W. W., Badinga, L., Savio, J. D., Meidan, R., Lew, B. J, et al. (1995) Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction*. 52, 1106-13.
- Yamamoto, M, Suzuki, T, Ooe, M, Takagy, M. & Kawaguchi, M. (1992) Efficacy of single vs multiple injection superovulatory regimes of FSH using polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*. 37, 325