



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA UTILIZACION DE PMSG Y FSH EN LA SUPEROVULACION DE GANADO BOVINO

T E S I S

Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a n

Silvia Patricia Arriola Arovez
María del Rosario Jacob Zamudio



Asesor de Tesis:
M.V.Z. Rafael Ordoñez Medina



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	14
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS Y DISCUSION	17
CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS	30

JURADO

PRESIDENTE; MVZ. SERGIO CORTEZ HUERTA
SECRETARIO; MVZ. RAFAEL ORDÓÑEZ MEDINA
VOCAL; MVZ. ANGEL RODRIGUEZ VALTIERRA
1er. SUPLENTE; MVZ. ANTONIO SANDOVAL VILLALBA
2do. SUPLENTE; MVZ. FERNANDO OSNAYA GALLARDO

INTRODUCCION

En la actualidad, sigue siendo uno de los principales problemas en el mundo, la producción de proteína de origen animal. Dentro de la producción animal han habido grandes adelantos como lo son: LA INSEMINACION ARTIFICIAL y más reciente LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES. Estas en conjunto están contribuyendo en gran parte al mejoramiento genético del ganado, mayor producción de éste y en consecuencia se ha logrado acrecentar la producción de alimentos (7) (21) (55) (66).

En los últimos años, la transferencia de embriones ha empezado a ser una herramienta que permite acelerar el progreso genético, al aumentar la presión de selección de vacas (7) (21) (42), este método consiste en desarrollar un embrión en un animal de alto registro y transferirlo a otro de baja calidad genética, el cual, se encarga de gestarlo tal como sucede en cualquier preñez normal (42) (55). Los primeros intentos de transferencia embrionaria, fueron enfocados más a la experimentación que hacia la práctica. El primer trasplante lo llevó a cabo el biólogo Inglés Walter Heape en 1890, logrando transferir huevos fecundados de una coneja a otra durante el principio de la gestación (4) (8) (28) (34) (36) (42) (49) (68) (69). Engle realizó los primeros experimentos sobre superovulación en ratas, logrando con éxito la transferencia de embriones (36). Desde 1929, se demostró que la implantación de glándulas pituitarias son capaces de aumentar el número de óvulos por ovulación en los animales de laboratorio. A finales del decenio de 1930, se había logrado obtener gonodotropinas parcialmente puras; Cole y Hart, en 1930 observaron que la PMSG se encontraba en las cúpulas endometriales de la yegua preñada (16) (25) (43) (47) (48) (73). En el año de 1940, se demostró que la hormona foliculo estimulante (FSH), administrada en combinación con la hormona luteinizante (LH), induce a la superovulación en el ganado bovino. Esta técnica fue aplicada en la vaca por Casida, Nalbandou, Mcshan, Meyer y Wisnicky (36) (69). La transferencia embrionaria en ganadería se obtuvo del año de 1949 a 1951, realizándose varios experimentos; Umbaugh, Rowson y Dowling en 1949 en la oveja y la cabra, Warwick y Berry en 1949 en cerdas, Kuasnyky y Willett en 1951 en vacas,

en la yegua en 1970. En 1969 Rowson, Moore y Lawson perfeccionaron la técnica de trasplante por el método quirúrgico en la vaca y de 1970 a 1972, Rowson, Sugie, Drost y otros en 1976 (4) (34) (36) (42). En los últimos años y en virtud de los trabajos llevados a cabo principalmente en Cambridge, esta técnica ha cobrado gran notoriedad comercial, pues se ha demostrado que es posible obtener hasta el 70/90% de gestaciones (Rowson y Col 1969, 1971; 1972 Newcomb; Col 1978; Chistie y Col 1979; Newcomb y Col, Rowson 1980). (3) (11) (42) (36).

La posibilidad de aumentar en las distintas especies domésticas la descendencia de genotipos selectos, es el objetivo principal de la transferencia embrionaria en producción animal. Por lo tanto, la transferencia embrionaria es una técnica especializada que se basa en la ganancia del máximo número de óvulos fecundados (embriones) procedentes de las madres genéticamente superiores (donadoras), por medio de la superovulación y su trasplante a la hembra receptora, que sirve sólo como una incubadora biológica para el desarrollo del embrión trasplantado (4) (36) (42) (55). Uno de los principales propósitos de la superovulación, consiste en incrementar la cantidad de óvulos que una hembra libera en cada uno de sus ciclos estrales (11), ya que a pesar de que a los pocos días del nacimiento de los ovarios en los mamíferos tienen cientos de miles de oocistos, son pocos los que durante la vida reproductiva de la hembra llegan a ser ovulados, debido a que los folículos con sus oocistos son degenerados (47) (55). La vaca es una especie que normalmente desarrolla varios folículos durante el ciclo estral, pero generalmente sólo uno llega a madurar y a producir su descendencia (55). Es por lo anterior, que la superovulación es un valioso recurso para incrementar la tasa de reproducción de hembras genéticamente superiores, al favorecer el desarrollo y maduración de los folículos presentes en los ovarios, aumentando la producción de óvulos viables (34) (47) (55).

En la vaca la aparición de la pubertad es el inicio de la receptividad sexual, perteneciendo al grupo de animales poliestrículos con ac-

tividad sexual continua durante todo el año siendo su ovulación espontánea, (5) (6) (27). Con esta técnica es posible provocar que las vacas produzcan simultáneamente varios óvulos que son fecundados - por Inseminación Artificial, aumentando así la reproducción de las razas bovinas más valiosas (36).

Hasta la fecha se han estudiado varios métodos encaminados a producir superovulación, centrados generalmente en el empleo de hormonas folículo estimulantes, de las cuales la más comúnmente utilizada en la vaca ha sido la GONADOTROPINA DE SUERO DE YEGUA PREÑADA (PMSG), aunque muchos de los primeros trabajos fueron realizados con extractos pituitarios (25) (47) (51) (69). Otras gonadotropinas con igual o mayor respuesta a la PMSG, ha sido la FSH, el extracto pituitario anterior equino (HAP) y recientemente las menotropinas (Pergonal). Con el descubrimiento de las prostaglandinas (PGF2 alfa) y sus análogos (Cloprostenol, Estrumate, etc.) la metodología de la superovulación se simplifica, ya que el uso de dichos compuestos permiten - que el tratamiento con las gonadotropinas (FSH, PMSG, HAP, PERGONAL) se inicie en cualquier momento de la fase lútea o media del ciclo estral, además una mayor flexibilidad en el momento de la superovulación y un mayor control en la ocurrencia del estro y la ovulación (4) (10) (17) (20) (29) (47) (50) (69). Los tratamientos se desarrollan empíricamente, iniciándose la mayoría de ellos en la fase de transición del ciclo estral, que en la vaca se presenta aproximadamente en el 16° día del ciclo, siendo la duración de éste de 21.3 días como promedio, con lo que se busca estimular al desarrollo folicular al momento de la regresión lútea y maduración folicular normales antes de que disminuya los niveles endógenos de progesterona (27) (47). Por lo tanto, antes de iniciar el tratamiento, es necesario conocer cuando menos un ciclo estral de la donadora. En el tratamiento superovulatorio con PMSG, se utiliza una sola inyección de la hormona en la mitad del ciclo estral, basándose en la lenta desactivación de ésta en el organismo (10-12 días), este efecto se relaciona a su vida media que es más larga que las gonadotropinas endógenas (4) (12) (24) (42) (47) (51) (52) (53) (54) (74). Esta característica es explicada por ser una glucoproteína que posee más carbohidra-

tos que la FSH o LH (25); la PMSG es usada en forma liofilizada, es obtenida de la yegua preñada entre los 80 o 90 días, teniendo una considerable actividad de FSH y otra un poco menor de LH, esta combinación hormonal en un solo producto ofrece ciertas ventajas, ya que ambos efectos son necesarios y sus acciones son de tipo sinérgico, para lograr un crecimiento folicular múltiple la dosis requerida fluctúa entre 1500 a 5000 UI por vía intramuscular en un volumen no mayor a 5 ml. (14) (30) (28) (36) (43) (47) (51) (68) (69). Otras de las gonadotropinas utilizadas son las Hipofisiarias la FSH y LH, son glucoproteínas que tienden a sustituir a la PMSG, ya que se han obtenido respuestas superovulatorias significativamente mejores (48) a pesar de ello, al igual que en la PMSG, la variabilidad en la respuesta ovulatoria a la FSH es grande e impredecible. Estas hormonas, por lo general son obtenidas a partir de adenohipofisis de animales de rastro, envasados en forma liofilizada y restituida con solución salina esteril; la FSH es administrada en una serie de inyecciones programadas para causar una estimulación ovárica óptima, pues dichas preparaciones son removidas rápidamente de la corriente sanguínea, ya que su vida media en el bovino es de 2 a 5 horas (15), la dosis varía de 28 a 50 mg., usando dosis constante o decreciente, sin embargo, no es posible aun contar con un tratamiento estándar que dé óptimos resultados. También parece tener poca o ninguna ventaja la inclusión de hormona luteinizante (LH) exógena con la FSH (4) (15) (16) (25) (28) (36) (39) (43) (48) (50) (68) (69). La gran variación a la respuesta superovulatoria, ha propiciado la búsqueda de nuevas hormonas que produzcan mejores resultados, entre los que se encuentran el EXTRACTO DE LA PITUITARIA ANTERIOR EQUINA (HAP) que tiene respuestas similares a la PMSG, aunque en vaquillas produce un mayor número de folículos anovulatorios (47) (50); cuando se comparó con la FSH, la respuesta ovulatoria fué ligeramente menor; se administra una vez al día durante 3 a 5 días, la aplicación de la PGF2 alfa es aplicada al tercer día de la inyección de HAP (13) (47). También existe la secreción de las copas endometriales de la yegua preñada (PMEG) que tiene efectos similares a la PMSG, al igual que su dosificación, así como el momento de aplicación (47).

Una de las más recientes es la gonadotropina menopausica humana - (HMG) que tiene una actividad FSH y es conocida con el nombre de Pergonal, es aplicada en una serie de inyecciones en cualquier momento de la fase lútea del ciclo estral (1) (20). Todas estas hormonas aunque no resulten ser significativamente superiores a la PMSG ó a la FSH, sí producen resultados equiparables a los de éstas (47).

En sí, la superovulación consiste en dos fases decisivas, la primera abarca el desarrollo del aparato folicular y la segunda, la ruptura folicular por el estímulo luteinizante, (42). (Basándose en estos principios existen dos métodos: uno en la estimulación durante la fase folicular y otro durante la fase lútea del ciclo estral (28) (36) (69). Por lo anterior, es necesario conocer un ciclo estral de la donadora, certificar la presencia de un cuerpo lúteo en cualquiera de los ovarios, de esto depende el tratamiento a elección. Si es en la fase de estimulación folicular con el uso de PMSG, se aplica el día 16 del ciclo estral (estro día cero) en una sola inyección con una dosis que fluctúa entre 2500 a 5000 UI por vía Im. (19) (28) (34) (36) (47) (59) (69) (70). Entrando en estro 3-4 días más tarde (42), en este momento, el nivel de progesterona empieza a disminuir, buscando con ésto estimular el desarrollo folicular normal (36) (47); en caso de utilizar FSH y LH, el animal es inyectado los días 16, 17, 18, 19, 20, con una dosis total entre 28 a 50 mg., manifestando la vaca celo el día 21; con este método no es necesario la aplicación de prostaglandina, ya que es aprovechada la regresión lútea normal (47), las dificultades de éste radican en el hecho de que es necesario conocer el período del ciclo estral en el que se encuentra la hembra (36) (69). En la estimulación durante la fase lútea con el empleo de PMSG, se inyecta en cualquier día del lapso entre 9 y 14 días después de presentado el estro (día 0) en una sola dosis que fluctua de 2500 a 5000 UI. por vía intramuscular (4) (12) (13) (14) (19) (21) (24) (25) (34) (42) (45) (47) (52) (53) (54) (55) (56) (71) (74), la ovulación se induce con un análogo de prostaglandina (Cloprostenol-Estrumate) 500 mg., ó (Dinoprost - Trometamina "Lutalyse") 25 mg., en una sola dosis aplicada a las 36

ó 48 horas después de la PMSG, el estro se presenta posteriormente en un período de 24, 48 ó 72 horas después de la inyección (13) (19) (21) (24) (34) (40) (42) (43) (47) (52) (53) (54) (56) (61) (74) (75). Con el empleo de la FSH se requieren una serie de inyecciones programadas en los días 9, 10, 11, 12 y 13 del ciclo estral, aplicadas 2 veces al día en dosis decrecientes, variando la dosis total de 28 a 50 mg. En vacas lactantes y vacas de carne de gran tamaño, se recomienda aumentar la dosis de FSH en un 50%, la aplicación de la prostaglandina se hace el día 11 del ciclo, apareciendo el estro 48 horas después de la aplicación (4) (17) (21) (23) (25) (28) (29) (35) (36) (39) (41) (42) (43) (47) (54) (55) (64) (65) (66) (69), ya que la prostaglandina y sus análogos sintéticos provocan la poliovulación de la fase lútea activa del ciclo, por su característica de producir lisis del cuerpo lúteo es utilizada en el control del estro en animales (yaca, oveja, cerda y yegua) (61). Es importante que la receptora se encuentre en la misma etapa del ciclo de la donadora, de otra forma, el medio uterino no resulta adecuado para el embrión transplantado y muere; por esto se recurre a la sincronización del estro del donador y receptora por medio de la prostaglandina y sus derivados, por que causan cambios fisiológicos en los órganos genitales, asegurando así mejores resultados de fecundación y sobrevivencia del embrión (42), la secuencia de la sincronización del animal donante es de la siguiente forma: cada uno de los animales seleccionados debe tener en el ovario el cuerpo amarillo correspondiente; al animal donante se le aplica la hormona correspondiente para el tratamiento superovulatorio; el animal receptor recibe solo la prostaglandina de 20 a 25 mg., ó la dosis correspondiente de sus análogos en una inyección que es aplicada 24 horas después de la estimulación superovulatoria del donante; el celo en estos animales se presenta en general a las 72-82 horas, sincronizándose de tal manera el celo del donante con el del receptor. Los celos de los animales receptores se vigilan con exactitud para poder seleccionar optimamente los que corresponden al animal donante. El animal superovulado donante responde más rápidamente a las prostaglandinas debido al efecto de la FMSG ó FSH, por presentar más folículos ováricos. Por lo general

presenta celos y ovulaciones a las 56 horas del tratamiento con inyección de prostaglandinas. (13) (19) (21) (24) (34) (40) (42) (43) (47) (52) (53) (54) (56) (61) (63) (74) (75), no todas las ovulaciones ocurren al mismo tiempo, algunas vacas pueden ovular durante un período de 5 a 7 días, la PGF2 alfa ha sido de gran utilidad en cuanto a esto, ya que reduce el tiempo de ovulación a 2 ó 3 días y ocurre el estro que dura aproximadamente la mitad de un día, la ovulación se va a presentar a las 12 horas después del final del estro, este es también al momento de la inseminación de la donadora, inseminando 2 ó 6 más ocasiones con dosis múltiples sin tomar en cuenta los signos estrales externos con intervalos de 12 horas, tomando el inicio del estro como punto de referencia; las dosis de inseminación deben contener por lo menos 50×10^6 de nemaspermos vivos prefiriéndose la inseminación con el semen líquido y fresco (27) (34) (35) (36) (41) (42) (45) (47) (65) (69) (71) (75).

El efecto superovulatorio va a depender de varios factores: a) De la calidad del producto hormonal; las preparaciones varían considerablemente de lote a lote, tanto en potencia como en contaminación, además de no estar estandarizadas de acuerdo a las respuestas ovulatorias de las diferentes especies de las que son utilizadas (47). b) De las diferencias entre genotipos; puesto que el ganado de carne responde mejor que el ganado lechero, e incluso se observan diferencias entre las razas, como por ejemplo en el ganado cebú, existe mejor respuesta al emplear dosis reducidas de hormona, habiendo mayor variación y mejor fertilización que al usar dosis mayores (2) (7) (28) (57) (69); e) Edad, donde se ha visto mejor respuesta en hembras de 5 a 9 años (35). d) Estado postparto; e) Epoca del año; — f) Estado nutricional, se ha observado que en vacas alimentadas con un incremento del 50% del total de nutrientes digestibles de lo recomendado por el NRC, existe un mayor diámetro folicular y un mayor volumen del ovario que los animales alimentados con niveles más bajos; (26). g) Estado de la actividad folicular ovárica natural, la cual es más pronunciada en los meses de primavera e invierno (42).

La respuesta ovárica alta superovulatoria puede resultar en una gran

alteración de los niveles hormonales normales, lo cual puede modificar subsecuentemente los ciclos estrales, por lo tanto, un intervalo de 1 ó 2 ciclos estrales completos entre cada tratamiento es recomendable, a sabiendas de que los ciclos estrales son modificados temporalmente por la superovulación (7) (47) (69), parece haber decremento en el número de embriones transferibles a partir de la cuarta superovulación (47). En la superovulación con la PMSG, existe variabilidad individual y frecuente por una sobre estimulación ovariaca, por la persistencia de muchos folículos no rotos, luteinizándose posteriormente e incrementando en forma anormal los niveles de esteroides al momento de la ovulación, reduciéndose la tasa de fertilización, así como el número de embriones desarrollados. Estas variables de superovulación, quizá se deban al tiempo largo de vida media de la PMSG, ya que ésta puede ser detectada 10 días después de la inyección intramuscular en las vacas (12) (24) (48) (62) (63). Una forma de controlar la vida media de la PMSG es mediante la inyección del anti-suero PMSG, al aplicar éste a la vaca de 72 a 120 horas después de la inyección de PMSG, controlaría el número medio de folículos desarrollados y la excesiva secreción de estrogénos (12) (37) (47) (69), además evita cualquier choque anafiláctico y en el caso de tratamientos repetidos, la producción de anticuerpos por la PMSG, ya que es una proteína extraña para la vaca. Sin embargo, el empleo del suero inmune anti-PMSG parece no reducir la variabilidad en la respuesta ovulatoria (12) (28) (37) (41) (69).

Por todo esto, se han hecho estudios llegando a la conclusión, que es mejor, la respuesta superovulatoria al primer tratamiento que en los posteriores (28) (41) (69)

La recolección es un paso muy importante en los programas de transferencia embrionaria, por lo que hay 3 puntos de especial interés que deben ser considerados: el día de la recolección, los medios empleados para la recolección y el método de recolección; ya que, los embriones pasan del oviducto hasta el día 7. El día de la recolección va a depender sobre todo del tipo de embrión requerido y el método de recolección. Para obtener un embrión en estado de morula,

la recolección se hace entre los días 6 y 7, para blastocitos deben de recolectarse entre los días 9 y 12 del ciclo estral, siendo el estro el día 0 (36). Los medios empleados para la recolección se iniciaron utilizando el medio TCM 199, pero ahora se emplean de manera más generalizada el buffer fosfatado Dulbecco, enriquecido con 1 % a 2 % de suero fetal bovino inactivado por el calor y - suplementando antibióticos, comumente en la preparación que sigue:

Suero Fetal Bovino	.1 al 2%
Penicilina	100 UI/ml.
Estreptomina	100 mg./ml.
Anfotericina B (Fungizone)	0.25 mg./ml.

Una vez acondicionado el suero fetal bovino y los antibióticos, el medio se calienta a la temperatura del cuerpo (37°C), su volumen depende del método de recolección, siendo para el quirúrgico de 100 ml. y el no-quirúrgico de 2 lts., (34) (36) (42) (69). En general se pueden colectar entre 40% y 80% de ovulos en relación con el número de cuerpos lúteos; dependiendo del método y la técnica de recolección (3) (34) (42), ya que el embrión de bovino no se adhiere intimamente al útero antes de 18 días, por lo que es posible obtenerlos sin cirugía hasta ese día, después del día 14 aumenta el riesgo de dañarlos. Se estima que entre el 6° y 9° día después del estro, es el mejor momento para extraer el mayor número de embriones normales - sin cirugía (36) (42) (69).

En general existen 3 métodos fundamentales de recolección ovular:

- 1.- Es el que aprovechan los animales en el matadero, recolectando los embriones de los organos aislados independientemente después del sacrificio.
- 2.- Se basa en la técnica quirúrgica por vía laparotómica, coleccionándose los embriones a través del lavado uterino o tubárico (36) (42) (73). Esta técnica presenta varias ventajas; la recuperación del 100% de los embriones, se requiere menor volumen - del medio, el número de ovulaciones puede ser observado, sin embargo, tiene sus desventajas, entre ellas están: el riesgo de -

muerte de la donadora, complicaciones post-quirúrgicas (infecciones, rompimiento de suturas, etc.), su alto costo, requiere de facilidades especiales, ya sea la disposición de una sala quirúrgica; solo se puede repetir 3 veces por la formación de adherencias, en algunas ocasiones el animal se vuelve infertil debido a éstas (9) (36) (60) (66) (69).

3.- Método no quirúrgico: el cual será utilizado en este trabajo.

Para su desarrollo pueden ser utilizados 2 tipos de aparatos: Flexible ó rígido; para el rígido se emplea el catéter modificado de Neilsen (9). En el caso del aparato flexible, requiere de un catéter de Foley largo de 3 vías ó salidas, 1 dilatador de cervix, 1 estilote, 1 bifurcación en forma de Y ó T, tubos de extensión y probetas; para realizar el lavado uterino transcervical, es necesario la preparación del animal, tranquilizándolo con Xylacina y bloqueándose la sensibilización vaginal por la aplicación de anestesia epidural, se sujeta al animal en una prensa con los cuartos delanteros levantados, se lava la vulva con suero fisiológico y se seca, se aplica a ésta alcohol, ya preparado el animal se introduce el catéter en la cavidad uterina, una vez introducido, una mano penetra en el recto dirigiendo la correcta colocación de éste, o sea el extremo llega a la porción superior del cuerno uterino; en este momento se infla el globo con aire de modo que ocluya la luz del cuerno, justo por detrás de la bifurcación. Se ensambla un aparato de inyección que puede ser una jeringa con un adaptador del tubo de entrada, luego manteniendo cerrado el tubo de recuperación, se penetra a presión un volumen de 15 ml. del medio para llenar el tubo, se introduce el medio necesario para producir turgencia del útero, el cual se determina por palpación rectal, semejándose el cuerno a la preñez de 35 días en la novillona y de 45 días en la vaca, luego se abre el tubo de recuperación y se obtiene el medio de colección en un recipiente adecuado. La manipulación del útero a través del recto permite una mayor recuperación del medio, por lo general esta operación se repite unas 3 veces para garantizar una mayor recuperación de embriones. Se utilizan unos 500 ó 1000 ml.

del medio para cada lavado si se observa la presencia de cuerpos lúteos en ambos ovarios, es necesario lavar ambos cuernos, después de las infusiones, se desinfla el globo y se retira el catéter; la introducción de una solución antiséptica en el útero después de acompletar el lavado, se garantiza la salud del aparato reproductor del animal.

La ganancia de embriones alcanza un promedio de 69% con los mejores resultados realizando la colección el día 7 y 8 del ciclo.

(3) (9) (14) (22) (32) (34) (35) (36) (42) (60) (66) (70) (72) .

El lavado se colecciona en un cilindro, dejándose sedimentar durante un lapso de 30 min. Posteriormente la mayor parte del medio se elimina por caída libre quedándose sólo 100 a 150 ml. del sedimento, que es un procesado para la búsqueda de embriones (42). También se ha desarrollado un simple sistema de filtración para el resto del fluido (sobrenadante), este se hace pasar por un cedazo de 56 mm. - del tamaño de un poro y es examinado para la obtención de embriones. (3).

La selección de embriones se basa en el análisis de la estructura morfológica del embrión, con la ayuda del microscopio estereoscópico, el cual nos determina el aspecto y probabilidades de desarrollarse después del trasplante. Sin embargo, ya existen los métodos de diagnóstico de viabilidad de los embriones bovinos más exactos, basados en la fluorescencia celular (36) (42) (65) (69). La conservación de los embriones puede ser de corto plazo para trasplante inmediato; en el medio TOM-199, dura hasta 6 horas, en el Dulbecco pueden sobrevivir bajo la temperatura de 20 a 37°C de 24 a 48 horas. El Oviducto de coneja, viven hasta 5 días que sirve también como animal de transporte de los embriones. Para largo plazo es necesario la congelación de los embriones (36) (42) (69).

La determinación del sexo de los embriones se logra haciendo un pequeño corte del embrión para obtener el cariotipo y por el reconocimiento de los cromosomas XX y XY para esto, generalmente son utilizados los blastocitos (36).

La mayor parte de los trasplantes embrionarios son de tipo quirúrgico, aunque se están utilizando métodos no quirúrgicos, lo que sin lugar a dudas sustituirán a los primeros. Existen 3 formas quirúrgicas: Medio ventral, por el flanco y por camulación de la trompa de falopio u oviducto (36). El animal receptor es preparado para cirugía. Se le expone el aparato reproductor y se determina la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario, ya que sin él, no es posible mantener la preñez. Después de que se ha seleccionado el embrión, es recolectado en una pipeta pasteur o un tubo capilar de vidrio, se hace una punción en el útero a través del cual se introduce la pipeta y se deposita el embrión, debe colocarse en el cuerno ipsilateral (del mismo lado) del ovario que presenta el cuerpo lúteo. Si se desea desarrollar gemelos, se transplanta otro embrión al cuerno contralateral (60) (69) (70).

El método de trasplante no-quirúrgico, se asemeja a la inseminación artificial, ya que el embrión es colocado dentro de un tubo muy fino, el cual se introduce hasta el cuerno ipsilateral donde se deposita. Se han obtenido hasta 50% de gestaciones mediante trasplantes bilaterales a través del cuello uterino. Las principales dificultades provienen de las infecciones, ya que el útero es muy susceptible en ese momento, pues está bajo la influencia de la progesterona (22) (36) (69) (72).

Las aplicaciones y cualidades del trasplante embrionario son muy bastas; en el área de investigación sobre reproducción animal, ofrece tanto en animales de laboratorio como en aquellos de interés zootécnico, la posibilidad de estudiar con amplitud los problemas fundamentales relacionados con el embrión, su interacción con el útero y los ovarios maternos y fetos ambientales (11). Acelera el mejoramiento genético, aumenta la capacidad reproductiva de los animales, reduce el intervalo entre generaciones, por medio de la superovulación en vaquillas de 4 a 6 meses de edad aumenta la tasa de gemelaridad; transporte internacional de genoma diploide con bajo riesgo de transmisión de enfermedades. El congelamiento de embriones elimina la necesidad de transferencia inmediata a los animales

receptores. En lo que concierne a animales de laboratorio, permite la conservación de cepas endocrinas, con la consiguiente protección contra riesgos de incendio, enfermedades y conservación de cepas mutantes. Produce quimeras, ya que es posible tener mezclas de potencial genético de 2 razas, por ejemplo: del Bos-Indicus y del Bos-Taurus, para conseguir beneficios de ambos en uno solo. Un aspecto contemplado por los investigadores es el de separar las células blastodérmicas, para producir clones (población que genera un solo individuo) de un mismo embrión antes de llegar a la fase de blastocisto (4) (6) (7) (11) (28) (36) (49) (58) (69).

Se debe significar que toda manipulación de los elementos embrionarios conducirá a lo que se ha denominado ingeniería genética, al alcanzar este nivel delicado, se podrán manipular los cromosomas ó los genes del individuo futuro con el fin de lograr que éste sea lo más perfecto en relación al rendimiento que de él se espera. Por lo tanto, en el área de la producción animal, esto redundará en el máximo aprovechamiento de las especies que proporcionan alimento al hombre y contribuirá así, a solucionar el grave problema que se avecina, la falta de alimentos (11) (49).

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo será determinar la eficacia de los tratamientos superovulatorios con una preparación comercial de FSH, contra otra de PMSG, siendo los puntos a comparar: el número de -- cuerpos lúteos y número de embriones transferibles. En base a la -- prueba estadística; comparación de dos medias con muestras independientes.

MATERIAL Y METODOS

Para la elaboración de este trabajo se utilizaron:

19 vacas donadoras en el Rancho "El Colorado" Querétaro, Qro.

Las hormonas utilizadas son: - Gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG)

- Folículo estimulante (FSH).

- Prostaglandina F₂ alfa (PGF₂ALPHA).

Dosis de semen congelado.

Medio de recolección Dulbecco.

Catéter de Foley.

Estilete.

Bifurcación en forma de Y.

Tubos de extensión.

Probetas.

Cajas de petri.

Jeringas desechables.

Xilazina (Rompun)

Xilocaína al 2%

Microscopio estereoscopio.

(9) (11) (28) (36) (41) (42) (69).

METODO:

Las vacas donadoras se seleccionaron en base a su calidad reproductiva y por tener alto potencial genético. Debiendo presentar condiciones como: haber tenido más de 45 días post-parto, haber presentado dos celos normales, tener un cuerpo lúteo funcional, no tener historia de partos distócicos o irregularidades reproductivas (retención placentaria, ausencia de defectos anatómicos, alteraciones durante el puerperio), encontrarse en un buen estado nutricional y de salud, tener de tres a diez años de edad. (7) (11) (36) (44) (69).

Se dividieron en dos grupos A y B; el grupo A con 8 vacas fue superovulado con la hormona PMSG, el grupo B con 11 vacas, se superovuló con FSH (25) (41) (59).

Al grupo A, se le aplicó una sola dosis de PMSG de 3000 UI por animal, por vía intramuscular, el día 13 del ciclo estral (día 0 estro), después de 24-48 horas de la inyección con PMSG, se les administró una dosis de 30 mg. de PGF₂ alfa, por vía IM. (28) (36) (41) (42) (69).

En el grupo B, la dosis de FSH fue de 40 mg. por vía IM. dividida en 8 dosis, aplicadas dos diarias con intervalos de 12 horas, y disminuyendo progresivamente en cuatro días, empezando el tratamiento el día 9 del ciclo estral. La secuencia de la aplicación es la recomendada por Elsdén (1980).

Día 9 del ciclo	8 mg.	12 horas	8 mg. FSH
Día 10 "	6 mg.	"	6 mg. "
Día 11 "	4 mg.	"	4 mg. "
Día 12 "	2 mg.	"	2 mg. "

Posterior a la primera inyección de FSH, a las 72 horas ó el día 11 del ciclo estral, se aplicó una sola dosis de 30 mg. de PGF₂ALPHA por vía intramuscular. (21) (25) (28) (36) (41) (42) (46) (47) (68) (69).

Cuando se presentó el estro en ambos grupos, los animales se inseminaron con 5 dosis de semen congelado en presentación comercial; esto es, a las 12 horas de haberse iniciado el estro, con 2 dosis de semen, una segunda aplicación a las 12 horas, con dos dosis y una tercera a las 12 horas. (36) (41) (69).

La recolección embrionaria se realizó a los 7 días de la última inseminación. (30) (41). Se les hizo palpación rectal y el método de recolección utilizado fué el no-quirúrgico, descrito anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSION

La respuesta superovulatoria a la inyección de PMSG y FSH, fue evaluada en el número de cuerpos lúteos en ambos ovarios y el número de embriones transferibles.

En el cuadro N° I se muestran los resultados obtenidos del tratamiento A, con 8 vacas superovuladas con PMSG y en el cuadro II los resultados del tratamiento B con 11 vacas superovuladas con FSH.

Los resultados obtenidos con la PMSG en cuanto al número de cuerpos lúteos por vaca, nos dió una media de 6.875, dando un porcentaje de embriones de $21.98\% \leq P \leq 47.11\%$ (cuadro III) y para FSH la media fue de 7.889 con un porcentaje de embriones de $56.72\% \leq P \leq 78.49\%$ (cuadro III). Se ha reportado que el promedio de ovulaciones con PMSG es de 5.5 por vaca, dando un porcentaje de embriones del 70% y de la ganancia de embriones para FSH es de 74% y 76%. Concordando los resultados obtenidos en este trabajo con lo reportado por estos autores. (42) (45).

La media de grado de ovulación para PMSG fue de $6.875 + 3.908$ y la media para embriones fue de $2.375 + 2.093$. Para FSH, la media de grado de ovulación fue de $7.889 + 2.189$ y la media para embriones fue de $7.00 + 3.263$; teniendo como resultado que el número de cuerpos lúteos por vaca para PMSG, puede ser de 3 a 11 y el número de embriones de 0 a 4 por vaca. Para FSH, el número de cuerpos lúteos por vaca será de 6 a 10 y el número de embriones de 4 a 10 (cuadro IV).

En el cuadro IV se comparan los resultados en el número de cuerpos lúteos del tratamiento A (PMSG) y tratamiento B (FSH); siendo estadísticamente no significativa la diferencia entre ambos tratamientos ($P \leq .05$) (gráfica 1). Comparando el número de embriones transferibles del tratamiento A y del tratamiento B, se obtuvo estadísticamente una diferencia significativa de $.01 < P < .05$ (gráfica 2). No hubo diferencia entre los preparados de PMSG y FSH en cuanto al nú-

mero de cuerpos lúteos; pero el tratamiento con FSH, resultó en un mayor número de embriones transferibles que para PMSG. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Crister, JR., et al. (1980) y Elsdén, R.P., et al. (1978) en donde la respuesta para FSH fue significativa ($P < .05$) que para PMSG.

Sin embargo es imposible predecir con certeza, el que una donadora pueda producir un número adecuado de embriones viables al tratamiento superovulatorio. Siendo el motivo de ello, la gran variación entre individuos y las respuestas ovulatorias a los tratamientos superovulatorios. Por lo tanto, la respuesta ovulatoria depende del tratamiento superovulatorio de elección, al método de estimación de la respuesta ovárica, siendo el más práctico y accesible la palpación rectal, aunque sea el de menor precisión, debido a que es imposible diferenciar los cuerpos lúteos de los folículos no rotos varios días después del estro. (5) (10) (25) (42) (47) (48) (63). También depende de la edad de los animales, dando mejor respuesta de 3 a 9 años, que en hembras más jóvenes. (35). Otra variabilidad en la respuesta al tratamiento con PMSG, es debida a la sobreestimulación ovárica, con la persistencia de muchos folículos no rotos; esto se podría evitar con el uso del antisuero específico de la PMSG, evitando el riesgo de una prolongada estimulación. (24).

CUADRO I

Vacas tratadas con PMSG (grupo A).

# DE ANIMAL	FECHA ULTIMO ESTRO	INICIO SUPEROVULACION	PMSG UI.	PGF ₂ ALPHA mg.	OVARIOS # DE CL	COLECCION # DE EMBRIONES
1	8-IX-83	21-IX-83	3,000	30	8	3
2	8-IX-83	21-IX-83	3,000	30	10	6
3	10-XI-83	23-XI-83	3,000	30	2	NO HUBO
4	10-XI-83	23-XI-83	3,000	30	7	2
5	10- I -84	23- I -84	3,000	30	8.	2
6	10- I -84	23- I -84	3,000	30	5	NO HUBO
7	2-IX-84	15-IX-84	3,000	30	15	6
8	2-IX-84	15-IX-84	3,000	30	NO HUBO	RESPUESTA

C U A D R O 11

Vacas tratadas con FSH (grupo B).

# DE ANIMAL	FECHA ULTIMO ESTRO	INICIO SUPEROVULACION	FSH mg.	PGF ₂ ALPHA mg.	OVARIOS # DE CL	COLECCION # DE EMBRIONES
1	30-VI-83	9-VII-83	40 4-3-2-1	30	7	2
2	29-VII-83	7-VIII-83	40 4-3-2-1	30	5	4
3	9-VIII-83	18-VIII-83	40 4-3-2-1	30	5	2
4	3-X-83	13-X-83	40 4-3-2-1	30	6	9
5	17-XI-83	26-XI-83	40 4-3-2-1	30	13	7
6	18-XII-83	28-XII-83	40 4-3-2-1	30	EXTREMADA RESPUESTA	14
7	21-I-84	31-I-84	40 4-3-2-1	30	8	2
8	21-I-84	31-I-84	40 4-3-2-1	30	12	12
9	1-II-84	10-II-84	40 4-3-2-1	30	EXTREMADA RESPUESTA	15
10	17-II-84	27-II-84	40	30	8	6
11	19-II-84	1-III-84	40 4-3-2-1	30	7	4

C U A D R O I I I

% DE EMBRIONES OBTENIDOS DEL TOTAL DE CUERPOS LUTEOS PARA
EL TRATAMIENTO A Y B .

$$p = \frac{b}{n} = \frac{19}{55} = 0.3455$$

$$p = \frac{b}{n} = \frac{48}{71} = 0.6761$$

$$P = p \pm Z_0 \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

$$P = p \pm Z_0 \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

$$P = 0.3455 \pm (1.96) \sqrt{\frac{(0.3455)(0.6545)}{55}}$$

$$P = 0.6761 \pm (1.96) \sqrt{\frac{(0.6761)(0.3239)}{71}}$$

$$P = 0.3455 \pm 0.1257$$

$$P = 0.6761 \pm 0.1089$$

$$21.98\% \leq P \leq 47.11\%$$

$$56.72\% \leq P \leq 78.49\%$$

$1 - \alpha = 95\%$ de nivel de confianza

$Z_0 = 1.96$

$n =$ No. de cuerpos lúteos totales

$P =$ proporción (%) de embriones en la población (verdadera).

CUADRO IV

COMPARACION DE LOS DOS TRATAMIENTOS CON MUESTRAS INDEPENDIENTES,
ANALIZANDO EL NUMERO DE CUERPOS LUTEOS Y EL NUMERO DE EMBRIONES.

DATOS

<u>TRATAMIENTO A</u>				<u>TRATAMIENTO B</u>			
(PMSG)				(FSH)			
Cuerpos Lúteos		Embriones		Cuerpos Lúteos		Embriones	
X_A	X_A^2	X_A	X_A^2	X_B	X_B	X_B	X_B^2
8	64	3	9	7	49	2	4
10	100	6	36	5	25	4	16
2	4	0	0	5	25	2	4
7	49	2	4	6	36	9	81
8	64	2	4	13	169	7	49
5	25	0	0	8	64	14	196
15	225	6	36	12	144	2	4
0	0	0	0	8	64	12	144
				7	49	15	225
55	531	19	89			6	4
				71	625	77	775

	<u>Cuerpos Lúteos</u>		<u>Embriones</u>	
	A	B	A	B
n	8	9	8	11
gl.	7	8	7	10
\bar{X}	6.875	7.889	2.375	7.00
S	4.673	2.848	2.504	4.858
To.	2.365	2.306	2.365	2.228
e	3.908	2.189	2.093	3.263
*M	2.967-10.793	5.700-10.078	0.282-4.468	3.737-10.263
	(3 - 11)	(6 - 10)	(0 - 4)	(4 - 10)

$1-\alpha = 95\%$ de nivel de confianza.

gl. = n-1

* Intervalo de confianza para estimar M: $M = \bar{X} \pm T_o S/\sqrt{n}$

$e = T_o S/\sqrt{n}$

$M = \bar{X} \pm e$

Hipótesis: $H_0 : M_A = M_B$ ($M_A - M_B = 0$) (A y B son iguales)

(M_A es el No. promedio de cuerpos lúteos para Trat. A)

(M_B " " " " " " " " B)

$H_1 : M_A \neq M_B$ ($M_A - M_B \neq 0$) (A y B son diferentes)

$$\begin{pmatrix} >0 & A>B \\ <0 & B>A \end{pmatrix}$$

$$\bar{X}_A = \frac{\sum X_A}{n_A} = \frac{55}{8} = 6.875 \quad \bar{X}_A = 6.875$$

$$\bar{X}_B = \frac{\sum X_B}{n_B} = \frac{71}{9} = 7.889 \quad \bar{X}_B = 7.889$$

$$\bar{X}_A - \bar{X}_B = 6.875 - 7.889 = -1.014$$

$$(n_A - 1) S_A^2 = \sum X_A^2 - (\sum X_A)^2 / n_A = 531 - (55)^2 / 8 = 152.875$$

$$(n_A - 1) S_A^2 = 152.875$$

$$(n_B - 1) S_B^2 = \sum X_B^2 - (\sum X_B)^2 / n_B = 625 - (71)^2 / 9 = 64.889$$

$$(n_B - 1) S_B^2 = 64.889$$

$$S_{\bar{X}_A - \bar{X}_B} = \sqrt{\frac{\frac{n_A + n_B}{(n_A)(n_B)}}{\left[\frac{(n_A - 1)S_A^2 + (n_B - 1)S_B^2}{gl = n_A + n_B - 2} \right]}} = \sqrt{\frac{8+9}{(8)(9)}} \left[\frac{152.875 + 64.889}{15} \right]$$

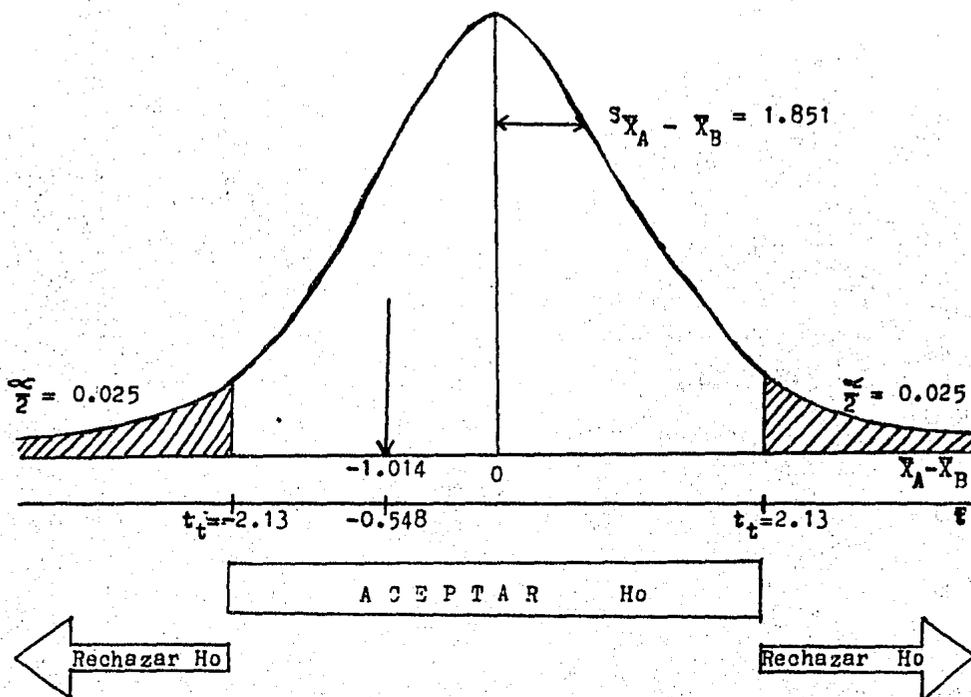
$$= \sqrt{\frac{17}{72} \times \frac{217.764}{15}} = \sqrt{3.428} = 1.851$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{S_{\bar{X}_A - \bar{X}_B}} = \frac{-1.014}{1.851} = -0.548 \text{ n. s. (no significativo)}$$

como $-0.548 > -2.13$ aceptar H_0 ∴ A y B son iguales

GRAFICA No. 1

CUERPOS LIGTOS



$$\alpha = 5\%$$

$$gl = n_A + n_B - 2 = 15$$

$$t_t = 2.13$$

$$t_{\text{calc}} = -0.548$$

como $-0.548 > -2.13$ aceptamos H_0
 y \therefore A y B son iguales

Hipótesis:

$$H_0 = M_A = M_B \quad (M_A - M_B = 0) \quad (A \text{ y } B \text{ son iguales})$$

(M_A es el No. promedio de embriones para trat. A)

(M_B " " " " " " " B)

$$H_1 = M_A \neq M_B \quad (M_A - M_B \neq 0) \quad (A \text{ y } B \text{ son diferentes})$$

$$\left(\begin{array}{l} > 0 & A > B \\ < 0 & B > A \end{array} \right)$$

$$\bar{X}_A = \frac{\sum X_A}{n_A} = \frac{19}{8} = 2.375 \quad \bar{X}_A = 2.375$$

$$\bar{X}_B = \frac{\sum X_B}{n_B} = \frac{77}{11} = 7 \quad \bar{X}_B = 7$$

$$\bar{X}_A - \bar{X}_B = 2.375 - 7 = -4.625$$

$$(n_A - 1) S_A^2 = \sum X_A^2 - (\sum X_A)^2 / n_A = 89 - (19)^2 / 8 = 89 - (361) / 8 \\ = 89 - 45.125 = 43.875$$

$$(n_A - 1) S_A^2 = 43.875$$

$$(n_B - 1) S_B^2 = \sum X_B^2 - (\sum X_B)^2 / n_B = 775 - (77)^2 / 11 = 236$$

$$(n_B - 1) S_B^2 = 236$$

$$S_{\bar{X}_A - \bar{X}_B} = 1.885$$

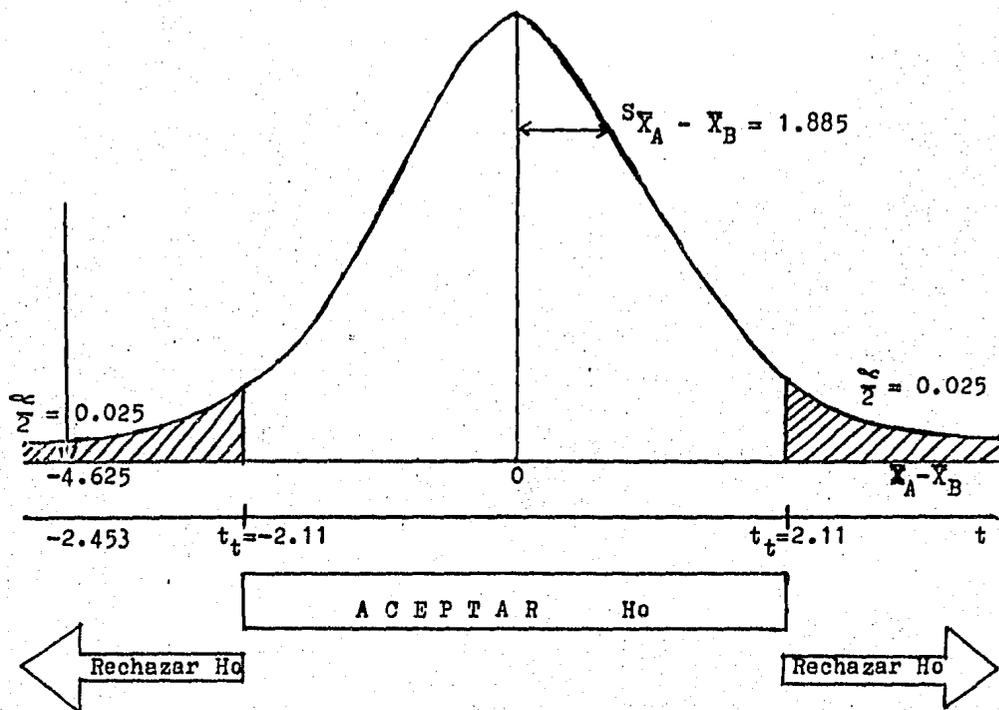
$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{S_{\bar{X}_A - \bar{X}_B}} = \frac{-4.625}{1.885} = -2.453$$

como $-2.453 < -2.11$ rechazar H_0

aceptamos $H_1 : \mu_A \neq \mu_B \therefore B > A$

GRAFICA No. 2

EMBRIONES



$$\alpha = 5\%$$

$$g_1 = 17$$

$$t_t = 2.11$$

$$t \text{ calc} = -2.453$$

como $-2.453 < -2.11$ rechazamos H_0
 aceptamos H_1 y \therefore A y B son diferentes

CONCLUSIONES

Por lo anterior, podemos concluir que la FSH da mejores resultados en transferencia embrionaria, que la PMSG. Debido a que el número de embriones transferibles de la FSH es mayor de 7.00 ± 3.263 (4-10) y para PMSG es de 2.375 ± 2.093 (0-4) embriones. Llegando a la misma conclusión reportada por Crister, J.R. (1980) y Elsden, R.P. (1978) (21) (25).

El empleo de la FSH tiende a sustituir a la PMSG a pesar de que ésta ha sido de mayor uso en los tratamientos superovulatorios, debido a que solo se requiere una sola aplicación por su larga vida media, pero con la FSH se han obtenido respuestas superovulatorias - significativamente mejores en el número de embriones viables (48) a pesar de ello, al igual que en la PMSG, la variabilidad de la respuesta superovulatoria a la FSH es grande e impredecible.

En general, la transferencia de embriones es costosa e involucra un riesgo financiero considerable. Por estas razones, su aplicación primordial por el momento, es la producción de piez de cría para - posteriormente ser promovidos y puestos al mercado por personas con mayor liquidez de capital. Sin embargo, conforme la tecnología mejora y su costo declina, un número cada vez mayor de criadores a pequeña escala están usando la transferencia de embriones en forma limitada.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alcivar, A.A; Maorer, R.R. and anderson LL. SUPEROVULATORY RESPONSES IN FSH OR PERGONAL TREATED HELFER; Theriogenology 19 1:109, 1983.
- 2.- Alexander, G.J.P.; Signoret and E.S.E., Hafez. Inseminación Artificial en: REPRODUCTION IN FARM ANIMALS, 4/e Ed. E.S.E. Hafez - Lea & Febiger; Philadelphia, 1980.
- 3.- Anne Pugh, A.O. Trounson, M.H.; Aarts and S. Mephee. BOVINE EMBRYO RECOVERY BY FILTRATION OF NON-SURGICAL FLUSHINGS. The rriogenology v.13 N°4, 281:286, 1980.
- 4.- Archibald James; Douglas C. Blood, James A. Henderson et al. REPRODUCTIVE AND URINARY SISTEMES; Merk Veterinary Manual 5/e Ed. Board, 816:817, 1979.
- 5.- Arriola Bueno Javier: ANATOMIA ENDOCRINOLOGIA Y CAMBIOS GENETICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL BOVINO. Memorias del curso sobre técnicas de transferencia embrionaria en bovinos UTESA 6-10, 1983.
- 6.- Arriola Bueno Javier: TRANSFERENCIA DE EMBRIONES. CEBU Ed. año dos mil vol. 10 N° 5, 1984.
- 7.- Asprón Pelayo, M.A.; SELECCION Y MANEJO DE DONADORAS. Memorias del curso sobre técnicas de transferencia embrionaria en bovinos UTESA. 33:56, 1983.
- 8.- Avery, T.L.; Fahning, V.G. and Graham, E.F. INVESTIGATION ASSOCIATED WITH THE TRANSPLANTATION OF BOVINE OVA. I.V. TRANSPLANTATION OF OVA. Journal of Reproduction an Fertility vol. 3,229:238, 1961.
- 9.- Baker, A.A. and Jillella, D. TECNIQUES OG SURGICAL AND NONSURGICAL OVA COLLECTION OF SUPEROVULATED COWS. En: Veterinary Record. vol. 103, 558-562, 1978.
- 10.- Betteridge, K.J. TECNIQUES AND RESULTS IN CATTLE; SUPEROVULATION IN EMBRYO TRANSFER IN FARM ANIMALS; Ed. K.J. Betteridge, Canada Department of Agricultura, Monograph, vol. 16, 1:9, 1977.
- 11.- Bianchi, N.O.; Merani, M.S.; Horgan, C.; Roldán, E.R.S.; Roldán, R.R. y Morini, L.L.; TRANSFERENCIAS EMBRIONARIAS En: Ciencia Interamericana, Vol. 19, N° 3-4, 24:27
- 12.- Bindon, B.M. and Piper, L.R.; INDUCTION OF OVULATION IN SHEEP - AND CATTLE BY INJECTIONS OF PMSG AND OVINE ANTI PMSG IMMUNE SERUM Theriogenology, vol. 8, N° 4, 171, 1977.

- 13.- Boland, M.P.; L.G. Kennedy, J.F. Crosby and I. Gordon: SUPER-OVULATION IN THE COW USING PMSG O HAP. Theriogenology, vol. 15 N° 1, 10, 1981.
- 14.- Brnad, A.A.O.; Trounsont, M.H.; Aarts, M. Drost: SUPEROVULATION AND NON-SURGICAL EMBRYO RECOVERY IN THE LACTANTING DAIRY COW. Anim. Prod. 26, 55:60, 1978.
- 15.- Casida, L.E.; Meyer, R.R.; N.H. Mcshan, and W. Wisnicky: EFFECTS OF PITUITARY GONADOTROPINS ON THE OVARIES AND THE INDUCTION OF SUPERFECUNDITY IN CATTLE. Amer. J. Vet. Res. vol. 4, 74:94, - 1943.
- 16.- Catchpole, H.R.; PHYSIOLOGY OF THE GONADOTROPINS HORMONES IN: H.H. Cole Gonadotropins. W.H. Freeman and Co. San Francisco, 40:70, 1963.
- 17.- Chupin, D. and R. Procureur. USE OF PITUITARY FSH TO INDUCE SUPEROVULATION IN CATTLE: EFFECT OF INJECTION REGIMEN Theriogenology, vol. 17 N° 1, 81, 1982.
- 18.- Chupin, D. and R. Procureur: PREICTION OF BOVINE OVARIAN RESPON SE TO PMSG BY ULTRASONIC ECHOGRAPHY. Theriogenology, vol. 19, 1:19, 1983.
- 19.- Church, R.B.; Shea, B: SOME ASPECTS OG BOVINE EMBRYO TRANSFER. Scientific and technical information and information mangement, 73:86, 1976.
- 20.- Critser, E.S.; Criser J.K. Winch, R.P. and C. Eitts.: EFFICACY OF PERGONAL AS A SUPEROVULATORY DRUG IN CATTLE. Theriogenology, vol. 17, 1:83.
- 21.- Critser, J.K.; R.F. Rowe; M.R. del campo and O.J. Ginther. EMBRYO TRANSFER IN CATTLE: FACTORS EFFECTING SUPEROVULATORY - RESPONSE, NUMBER OF TRANSFERABLE EMBRYOS, AND LENGTH OF POST-TREATMENT ESTROUS CYCLES. Theriogenology, vol. 13 N° 6, 397, - 401, 1980.
- 22.- Curtis, J.L.; R.P. Elsdon and G.F. Seidel, Jr.: NON-SURGICAL TRANSFER OF BOVINE EMBRYOS, Theriogenology, vol. 15, N° 1, 1981.
- 23.- Darron, G.M. Lindner and G.G. Goemann.: SUPEROVULATION AND FER-TILITY IN LACTATING AND DRY DAIRY COWS. Thericgenology vol. 17 N° 1, 84, 1982.
- 24.- Dhondt, D; R. Bouters; J. Spince Maitle; M. Coryn and M. Vande Flasche.: THE CONTROL OF SUPEROVULATION IN THE BOVINE WHITH A PMSG ANTI-SERUM. Theriogenology, vol. 9, N° 6, 529:533, 1978.

- 25.- Elsdén, R.P.; L.D. Nelson and P.E. Seidel Jr. SUPEROVULATING COWS WITH FOLLICICLE STIMULATING HORMONE AND PREGNANT MARE'S SERUM GONADOTROPHIN. Theriogenology, vol. 9, N° 1, 17:26, - 1978.
- 26.- Escamilla Gallegos, I.; EFECTOS NUTRICIONALES SOBRE LA REPRODUCCION DE LAS LECHERAS. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Depto. de Reproducción, UNAN. 1978.
- 27.- Fernández Vaca Saúl: ASPECTOS FISIOLÓGICOS DEL CICLO ESTRAL DEL BOVINO. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Depto. de Reproducción. UNAN. 1978.
- 28.- Fuentes, V.O. y Sumano, H.S.; FARMACOLOGÍA VETERINARIA: Gonadotropinas y problemas reproductivos. 343:351 Ed. Fuente, V.O. y Sumano, H.S. 1982.
- 29.- García, G.J.K., Seidel Jr. and R.P. Elsdén.; EFFICACY OF SHORTEN ED. FSH TREATMENT FOR SUPEROVULATING CATTLE. Theriogenology. 1982.
- 30.- Goodman, L.S. y GILMAN, A.; BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPÉUTICA 5/e; Hormonas y antagonistas de hormonas Cap. 66 Ed. Interamericana 1978.
- 31.- Greve, T.; EGG TRANSFER IN THE BOVINES EFFECT OF INJECTING PMSG ON DIFFERENT DAYS. Theriogenology, vol. 5, N° 1, 15:19, 1976.
- 32.- Greve T. and H. Lehn-Jensen.; FERTILITY OF HIGH-YIELDING DAIRY COWS FOLLOWING SUPEROVULATION AND NON-SURGICAL RECOVERY OF EMBRYOS. Theriogenology, vol, 9, N° 4, 353:358, 1978.
- 33.- Grunert, E.; LA PROSTAGLANDINA, PROGRESO AUTÉNTICO EN TRATAMIENTO DEL GANADO BOVINO. El libro azul, 16:461, 1977.
- 34.- Hafez, E.S.E.; REPRODUCCION E INSEMINACION ARTIFICIAL EN ANIMALES 4/e, Ed. Interamericana 1/e en español, cap. 5, 497:551, - 1984.
- 35.- Hasler, J.F.; Brooke G.P. and Mc. Cauley, A.D.; THE RELATIONSHIP BETWEEN AGE AND RESPONSE TO SUPEROVULATION IN HOLSTEIN COWS AND HEIFERS. Theriogenology. vol. 15, N° 1, 109, 1981.
- 36.- Jiljella, D.; EL TRANSPLANTE DE EMBRIONES EN GANADO BOVINO. Folletos de Zootecnia No. 1, Jul. 1982, Depto. de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chapingo.
- 37.- Kummer, V.; Zrakly, Z. Holcar, V. Veznik Z., Schlegelova, J. - and Hroska, K.; SUPEROVULATION IN CATTLE; EFECTO OF GOAT ANTI-PMSG SERUM. Theriogenology, vol. 14, 383:390, 1980.

- 38.- Log R.G., R. Remstein; D.O. Canna, And R.H. Douglas.; CONTROL OF OVULATION IN CYCLING MARE'S WITH OVARIAN STEROIDS AND PROS TAGLANDIN. Theriogenology, vol. 15, N° 2, 191, 1981.
- 39.- Looney, C.R.; Boutle, B.W.; Archibald, L.F. and Godke, R.A.: COMPARISON OF ONCE DAILY AND TWICE DAILY FSH INJECTIONS FOR - SUPEROVULATING BEEF CATTLE. Theriogenology, vol. 15, 13:22, 1981.
- 40.- Louis, T.M.: OVULATION FERTILITY AND ENDOCRINE RESPONSE AFTER PROSTAGLANDIN F2 ALPHA IN CATTLE. Dissertation Abstracts Inter national, B, 36,6, 2645, 1975.
- 41.- Lubbadah, W.F.; Graves, C.N. and Spahr, S.L.: EFFECT OF REPEA- TED SUPEROVULATION ON OVULATORY RESPONSE OF DAIRY COWS. Journal of animal science, vol. 10, N° 1, 1980.
- 42.- Lubos Holy: BASES BIOLÓGICAS DE LA REPRODUCCION BOVINA 1/e, Ed. Diana, S.A. Cap. 14, 220;238, 1983.
- 43.- Mapletoft, R.J.; Johnson, W.H. and Adams, W.M.: EFFECTS OF PRO GESTAGEN EAR IMPLANT ON SUPEROVULATORY RESPONSE IN THE COW. - Theriogenology, vol. 13 N° 1, 102, 1980.
- 44.- Mapetoft, R.J.; Johnson, W.H. and Miller, D.M.: EMBRYO TRANSFER TECHNIQUES IN HANDLING REPEAT BREEDING COWS. Theriogenology, - vol. 13, N°1, 103, 1980.
- 45.- Maxwell, D.P.; Massey, J.M. And Kraemer, D.C.: TIMING OF OVULA TIONS IN THE SUPEROVULATED BOVINE. Theriogenology, vol. 9, N°1, 97, 1978.
- 46.- Mc. DONALD, L.E.; REPRODUCCION Y ENDOCRINOLOGIA VETERINARIAS 1/e. Aparato reproductor de la hembra cap, 10 ed, Interameri- cana, S.A. 1971.
- 47.- MEMORIAS DEL CURSO SOBRE TECNICAS DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN BOVINOS U.T.S.A. Técnicas de superovulación en ganado bovi- no. 57:81, 1983.
- 48.- Monniaux, D.D.; Chupin and J. Saumande: SUPEROVULATORY RESPON- SES OF CATTLE. Theriogenology, vol. 19, N° 1, 55.81, 1983.
- 49.- Monterrubio Saénz Gabriel; LA INDUSTRIA DEL TRANSPLANTE DE EM- BRIONES. Memorias del curso sobre técnicas de transferencia - embrionaria en bovinos U.T.E.S.A. 1:5, 1983.
- 50.- Moore, N.W.: THE CONTROL OF TIME OF OESTRUS AND OVULATION AND THE INDUCTION OF SUPEROVULATION IN CATTLE AUST. J. Agric. Res. 26, 295;304, 1974.
- 51.- Moore, R.W.; Smith J.F.: EXOGENOUS HORMONE AN CATTLE OESTRUS, J. Agric. Res. 100, 1978.

- 52.- Muluchill, P.; Sweenan J.M.; USE OF PMSG WITH SYNCRONIZATION 174;175, 721264 A0045-03087, 1978.
- 53.- Nancarrow, C.D.; Miller, W.J.B.; FACTORS INFLUENCING OESTRUS SYNCRONIZATION RELATIVE TO SUPEROVULATION AND EGG TRANSFER. Scientific and Technical information and information management. 291:299 1976.
- 54.- Orihuela A.; Galina C.S.; Escobar J.; INDUCCION DE ESTRO CON PROSTAGLANDINA F2 ALPHA EN GANADO CEBU BAJO OBSERVACION CONTINUA. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 1982.
- 55.- Parra C. Alejandro: TRANSPLANTE DE EMBRIONES EN BOVINOS. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Depto. de Reproducción UNAN 1978.
- 56.- Phillipoo, M.; Rowson, L.E.A.; PROSTAGLANDINS AND SUPEROVULATIONAL IN THE BOVINE ANNALES DE BIOLOGIE ANIMALE. Biochimite, Biophysique, vol. 15 N° 2, 233:240, 1975.
- 57.- Plase, D., A.C. Warnick and M. Roger. REPRODUCTIVE OF BOSINDICUS FEMALES IN SUPOTROPICAL ENVIRONMENT. I.V. LENGTH OF ESTRUS CYCLE, DURATION OF ESTRUS, TIME OF OVULATION, FERTILIZATION - AND EMBRYO SURVIVAL IN GRADE BRAHAM HEIFERS. J Anim. Sci. 30:63, 1968.
- 58.- Randal, J. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA. En Información científica y tecnologfa. vol. 4, 64, 9:13, 1982.
- 59.- Roberts. OBSTETRICIA VETERINARIA Y PATOLOGIA DE LA REPRODUCCION TERIOGENOLOGIA. Cap. XII Fisiología en la reproducción de la hembra. Ed. Hemisferio sur. S.A. 1/e. 459-488, 1979.
- 60.- Rodriguez, C.D.; Frene, A.J, y Granate, H.; TRANSPLANTES EMBRIONARIOS EN BOVINOS. Gaceta veterinaria, 40(330), 1978.
- 61.- Sánchez A. Rafael, Antonio Zaplen, S. Oscar L. Rodríguez. SINCRONIZACION DEL ESTRO EN VAQUILLAS PRODUCTORAS DE CARNE CON UN ANALOGO SINTETICO DE PROSTAGLANDINA F₂ alpha. (memorias) VII - Congreso Nacional de Bufatria. 372-375, 1982.
- 62.- Saumande, J. and Chupin D. PRODUCTION OF PMSG ANTISERUM IN CATTLE; ASSAY OF INHIBITORY ACTIVITY AND USE IN SUPEROVULATED HEIFERS. Theriogenology, vol. 15, No. 1, 108, 1981.
- 63.- Saumande, J. and Chupin D. THE RELATION SHIP IN THE RESPONSE OF OVARIES OF SUPEROVULATED HEIFERS. Theriogenology, vol. 17 N° 1, 107, 1982.
- 64.- Schneider, H.J,Jr, Castleberry, R.S. and Griffit, J.L. COMERCIAL ASPECTS OF BOVINO EMBRYO TRANSFER. Theriogenology vol. 13, - 73-85, 1980.

- 65.- S. de los Santos, Y.A., Sánchez A. y G. Monterrubio S. SUPEROVULACION EN GANADO BOVINO EMPLEANDO HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE A DIFERENTES DOSIS. (Memorias) Reunión de Investigaciones Pecuarías en México, 1982.
- 66.- Seide, G.E.; Seidel Jr.; S.M. and Bowen, R.A. BOVINE EMBRYO - TRANSFER PROCEDURES. Colorado State University Experiment Station in Cooperation with Animal Reproduction Laboratory Colorado State University Fort. Collins, Colorado, 80523 Sept. 1978.
- 67.- Seidel, S.M. and G.E. Seidel Jr.; EMBRYO TRANSFER. Bibliography 11 Theriogenology vol. 13, N° 3, 237-248, 1980.
- 68.- Short, R.V. PAPEL DE LAS HORMONAS EN LOS CICLOS SEXUALES. En: Austin, C.R. y Short, R.V. Hormonas en la Reproducción Vol. 3, cap. 3 ed. Científicas "La Prensa Médica Mexicana, S.A." 42-72, 1982.
- 69.- Sorensen, Jr. A.M. REPRODUCCION ANIMAL PRINCIPIOS Y PRACTICAS. Cap. 11, Editorial Mc. Graw-Hill, 301-304, 370-376, 1982.
- 70.- Sreenan, J.M.: NON SURGICAL EGG RECOVERY AND TRANSFER IN THE COW. Veterinary Record, vol. 102, N° 3, 58-60, 1978.
- 71.- Sreenan, J.M.: BEEHAND METHODS OF UNDUCTION OF SUPEROVULATION IN THE COW AND TRANSFER RESULTS. "Scientific and Technical Information and Information. Management" 19-34, 1976.
- 72.- Trounson, A.D.: Ronson, L.E.A.; Willadsen, S.M. NON-SURGICAL TRANSFER OD BOVINE EMBRYOS VETERINARY RECORD, 102, 4, 74-75, 1978.
- 73.- Narwick, E.J. y Legates, J.L. CRIA Y MEJORA DEL GANADO 3/e cap. 3, Ed. Mc. Graw-Hill, 1980.
- 74.- Wettman, R.P. et al. THE RESPONSE OF ANGUS COWS TO INJECTION OF PROSTAGLANDIN AND PMSG. Research Report, Agricultural Experiment Station Okiahome State University, 1975.
- 75.- Wilson, G.R. et. al. ESTRUS SYNCHRONIZATION OF BEE, COWS WITH PROSTAGLANDINS. Beef cattle Day Research for Production, Wooster, U.S.A.; Ohio Agricultural. Research and Development Center, 12-13, 1977.
- 76.- Wayne W. D. Bioestadística. Base para el análisis de la Ciencia de la Salud. Ed. Limusa. 1982.