



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL**

**VIABILIDAD BIOLÓGICA Y ECONÓMICA DE LA
APLICACIÓN DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
CON PRODUCTORES DEL ESTADO DE TABASCO**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

MARCO ANTONIO ALARCÓN ZAPATA

TUTOR: DR. CARLOS SALVADOR GALINA HIDALGO
COMITÉ TUTORAL: DR. MANUEL DIONISIO CORRO MORALES
DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

MÉXICO, DF.

2008.



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 esta 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.

Agradecimientos

Al Doctor Carlos Salvador Galina Hidalgo, por la oportunidad que me dio de pertenecer a su grupo de trabajo y a sus invaluable consejos para seguir adelante.

Al Doctor Manuel D. Corro Morales, por su apoyo y amistad brindada durante mi estancia en las instalaciones de la universidad.

Al Doctor José A. Medrano Hernández, por sus atenciones y sugerencias en la realización de mi tesis.

A la MC Eva Patricia López Damián por su colaboración en la realización del trabajo de campo, así como por su amistad y apoyo brindado de corazón, (Gracias Paty).

Al Doctor Miguel Ángel Lammoglia Villagómez, por sus enseñanzas y consejos para poder seguirme superando.

A la Dra. Ivette Rubio Gutiérrez, por su amistad y confianza.

A la Señora Mercedes Arriaga, por su apoyo brindado durante mis estudios de posgrado.

Al Dr. Marco Antonio Asprón, por su invaluable colaboración en los trabajos de recolección, clasificación y criopreservación de los embriones.

Al grupo de ganaderos "TUMBAPATOS", por la oportunidad que me brindaron al trabajar en sus fincas, para llevar a cabo la realización de este trabajo.

Al Sr. Álvaro Potenciano, por su hospitalidad brindada durante mi estancia en Macuspana, Tabasco. (Descanse en Paz).

Al Departamento de Reproducción, por la oportunidad de ser miembro del mismo.

Al CONACYT, por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

A mis compañeros de trabajo Paty, Flavio, Abraham, Alex, Blanca, Mariana, Liliana, Dianita, Daniel y Mónica, por su apoyo, confianza y amistad brindada durante mi estancia en Repro.

Al honorable jurado, Dr. Carlos S. Galina Hidalgo, Dr. Manuel D. Corro Morales, Dr. Rafael Trueta Santiago, Dra. Norma Moreno Mendoza y Dr. Felipe Montiel Palacios por sus aportaciones para la elaboración de la tesis.

El presente proyecto fue financiado por:

- El programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT IN-201903).

Y realizado en:

- Rancho La escondida, Ags.
- Cuenca Lechera de Tizayuca, Hgo.
- Rancho Loma Linda, El Marqués, Qro.
- Rancho El Clarín, Mtz. de la Torre, Veracruz.
- GGAVATT “Tumbapatos”, Macuspana, Tabasco.

DECLARACION

El autor da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción o intercambio bibliotecario.

MVZ Marco Antonio Alarcón Zapata.

**Viabilidad biológica y económica de la aplicación de la
transferencia de embriones con productores del estado de
Tabasco.**

CONTENIDO

I.	Resumen.....	VI
II.	Abstract.....	VII
III.	Introducción.....	8
IV.	Revisión de literatura	
	4.1 Transferencia de embriones.....	10
	4.2 Ovulación Múltiple.....	11
	4.3 Métodos de recolección de embriones.....	13
	4.3.1 Métodos quirúrgicos.....	13
	4.3.2 Métodos no quirúrgicos.....	14
	4.4 Transferencia de los embriones.....	16
	4.4.1 Transferencia quirúrgica.....	17
	4.4.2 Transferencia no quirúrgica.....	18

4.5 Métodos de preservación

4.5.1 Refrigeración.....	19
4.5.2 Métodos de congelamiento.....	20
4.5.3 Congelación convencional	21
4.5.4 Método estándar.....	23
4.5.5 Método one step	25
4.5.6 Transferencia directa.....	26
4.5.7 Vitricación.....	28

4.6 Factores que determinan el resultado de la transferencia de embriones

4.6.1 Embrión.....	29
--------------------	----

4.7 Receptoras.....34

4.7.1 Raza.....	35
4.7.2 Edad.....	35
4.7.3 Estado nutricional.....	37
4.7.4 Reutilización de receptoras.....	37
4.7.5 Tamaño del cuerpo lúteo y nivel de progesterona de la receptora.....	38

4.8 Relación día de la donadora – día de la receptora.....38

4.9 Relación desarrollo del embrión – día de la receptora.....40

4.10 Transferencia del embrión.....41

4.10.1 Ubicación del embrión en útero y tiempo de transferencia	41
---	----

4.10.2 Alternativas de mejoramiento de fertilidad en transferencia de embriones.....	42
V. Objetivos.....	45
5.1 General	
5.2 Particular	
5.3 Hipótesis	
VI. Material y Métodos	
6.1 Producción de embriones	46
6.2 Criterios de selección de los productores.....	50
6.3 Selección y preparación de las receptoras.....	50
6.4 Transferencia de los embriones.....	51
6.5 Diagnostico de gestación.....	52
6.6 Análisis económico.....	52
VII. Resultados	
7.1 Repuesta a la ovulación múltiple.....	54
7.2 Producción de embriones.....	55
7.3 Costos de preparación por donadora.....	57
7.4 Costos de producción por embrión	
7.4.1 Donadoras <i>Bos taurus</i>	58
7.4.2 Donadoras <i>Bos indicus</i>	58

7.5 Edad de la donadora.....	58
7.6 Época del año.....	58
7.7 Sincronización de receptoras.....	59
7.8 Costos de preparación de receptoras.....	60
7.9 Costos por transferencia embrionaria.....	60
7.10 Costos por gestación.....	61
7.11 Estimación de resultados	
7.11.1 Costos por embrión.....	61
7.11.2 Costos por transferencia.....	62
7.11.3 Costos por gestación.....	63
VIII. Discusión.....	64
IX. Literatura Citada.....	69

Lista de esquemas

1.- Protocolo de ovulación múltiple para recolección de embriones.....	47
2.- Protocolo de sincronización de receptoras para transferencia de embriones.....	51

Lista de cuadros

1.- Costos de preparación por donadora.....	57
2.- Costos de preparación por receptora.....	60
3.- Costos de transferencia por embrión.....	60

Lista de gráficas

1.- Respuesta a la ovulación múltiple en donadoras <i>Bos taurus</i>	54
2.- Respuesta a la ovulación múltiple en donadoras <i>Bos indicus</i>	54
3.- Producción de embriones <i>Bos taurus</i>	55
4.- Producción de embriones <i>Bos indicus</i>	56
5.- Receptoras sincronizadas y seleccionadas.....	59
6.- Respuesta embrionaria en vacas <i>Bos taurus</i>	62
7.- Respuesta embrionaria en vacas <i>Bos indicus</i>	62

I.- RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la aplicación de la transferencia de embriones en ganado de productores comerciales del estado de Tabasco es económica y biológicamente viable, ya que diversos estudios han demostrado que existen factores que pueden afectar la respuesta en la producción de embriones en ganado *Bos taurus* y *Bos indicus*, así como el porcentaje de gestación se puede ver afectado por las condiciones que imperan en regiones tropicales. Se utilizaron 26 donadoras *Bos taurus* y 26 donadoras *Bos indicus*, las cuales fueron sometidas a un tratamiento de sincronización y ovulación múltiple para la producción de embriones. Se colectaron 81 y 80 embriones transferibles de cada raza respectivamente, los cuales fueron evaluados y clasificados de acuerdo a los criterios establecidos por la IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, por sus siglas en inglés). Para realizar la transferencia de los embriones fueron seleccionadas 9 explotaciones ganaderas en el municipio de Macuspana, Tabasco, en las cuales fueron seleccionadas 10 receptoras para transferirle un embrión a cada una. Las hembras fueron preparadas y sincronizadas mediante un protocolo de transferencia de embriones a tiempo fijo con la finalidad de evitar llevar a cabo una detección de calores continua. Los embriones fueron transferidos a receptoras que presentaron un cuerpo lúteo el día indicado para la transferencia (día 7 post ovulación), colocando un embrión en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con la estructura lútea, el diagnóstico de gestación se llevo a cabo 28 días posteriores a la transferencia mediante ultrasonografía con un equipo ALOKA SSD 500, con un transductor de 5 Mhz. La estimación de los costos se determinó de acuerdo al método de preparación de las donadoras y recolección de embriones, el cual fué de \$6,343.63 y \$5898.63 para *Bos taurus* y *Bos indicus*, respectivamente. De acuerdo a la respuesta obtenida en cada biotipo se determinó el costo por embrión; el costo por gestación se calculó de acuerdo al porcentaje de gestación y a los costos por preparación de receptoras y transferencia del embrión, así como el costo del embrión. El costo total por gestación fue de \$14,495.36 con un 27% de fertilidad.

Palabras clave: Transferencia de embriones, costos, ovulación múltiple, *Bos taurus*, *Bos indicus*, donadoras, receptoras.

II.- Abstract

The objective of this study was to determine if the technique of Embryo Transfer in cattle can be commercially feasible in the region of Tabasco as there are studies that have proved to affect the production of embryos in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. Moreover, the pregnancy percent can be affected in tropical regions due to the harsh environmental conditions. Twenty-six *Bos taurus* and *Bos indicus* female cows were synchronized and superovulated to obtain an average of eighty embryos of both sub-species. Embryos were classified by stereoscopic microscopy based on the quality criteria established by the IETS. Nine commercial farms from Macuspana Tabasco were chosen to provide ten recipient cows each to transfer one embryo per cow. The females were synchronized using a fix-time bovine embryo transfer protocol to avoid estrus detection. The recipients that had a corpus luteum on day7th were transferred an embryo placed in the ipsilateral horn to the corpus luteum. Pregnancy diagnosis was estimated twenty-eight days after embryo transfer by ultrasonography (ALOKA SSD 500, transducer 5 Mhz). The estimation of the cost was determined calculating the cost of preparation of the donor and embryo recovery which was \$650 USD and \$600 USD, *Bos taurus* and *Bos indicus*, respectively. The cost of each embryo was determined by the response to embryo recovery. The cost of gestation was calculated by the percentage of animals pregnant (27%), the cost for preparing the donor, the technique of embryo transfer and the cost of the embryo. The overall cost per gestation was \$1450 USD.

Key words: Embryo Transfer, cost, superovulation, *Bos taurus*, *Bos indicus*, donors, recipients.

III.- INTRODUCCIÓN

Con el paso de los años los productores del país principalmente del trópico mexicano han querido mejorar su ganado para aumentar la calidad de su producción, implementando programas como la transferencia de embriones (TE) que en su mayoría ha sido iniciada como investigación experimental, con apoyo de instituciones de gobierno y en pequeña proporción por asesores eventuales en los ranchos ganaderos.

A pesar de que la transferencia de embriones no es una herramienta reproductiva nueva, ya que desde hace más de un siglo se llevó a cabo con éxito la primera transferencia embrionaria en conejos, fue hasta 1951 para que se llevará a cabo con éxito esta técnica en bovinos (Betteridge, 1981) y hasta los años 70's cuando surge de manera comercial principalmente para razas europeas como la Holstein (Hasler, 2006). Sin embargo, debido al bajo impulso y el alto costo de estos programas como respuesta a la demanda de incrementar la producción pecuaria de las zonas tropicales, los gobiernos han impulsado proyectos locales con altos subsidios para promover el interés de los productores en la mejora de sus hatos lecheros a través de la TE. El impacto de estos programas ha generado gran controversia debido a que los productores que han sido incluidos o han participado en los programas no han quedado satisfechos. Debido a lo anterior los productores progresistas han recurrido a la introducción de bovinos especializados en la producción de leche, provenientes de zonas templadas (Hernández *et al.*, 1982) cuyo resultado ha sido una alta mortalidad tanto en adultos como en terneros y una mala eficiencia reproductiva, con beneficios muy bajos para ser rentables (Wilkins *et al.*, 1979; Morales *et al.*, 1981; Morales *et al.*, 1983).

Por lo tanto, uno de los principales problemas que afronta la ganadería en productores del trópico, es la falta de estrategias para obtener hembras de reemplazo que tengan un desempeño zootécnico que pueda elevar los parámetros productivos y reproductivos de la ganadería. La TE podría ser implementada como

una estrategia para proveer a los productores del trópico de los animales mas adecuados para este fin con la ventaja de ser criados por las propias hembras receptoras de embriones de los ganaderos sin hacer un gasto extra por la compra de reemplazos. Es por esto que la transferencia de embriones F1 Holstein/Cebú constituye una alternativa de primera elección, por ser el genotipo que mejor se comporta (Cunningham, 1989).

En cruzamientos de *Bos taurus* y *Bos indicus* para leche el desempeño de las F1 ha sido muy superior a los otros cruzamientos. La utilización de estas permite aprovechar la heterosis al máximo, pero requiere la manutención de las razas puras y la compra de hembras de reemplazo. En Brasil y en otros países existe un mercado incipiente para vaquillas y terneras F1 Holandés/Cebú y se ha sugerido un sistema simple de reemplazo continuo con F1 (Madalena, 1997), así mismo en estos cruzamientos la epistasis ha sido importante para peso al destete, para producción de leche y mortalidad de terneras (Madalena, 2001).

Molina (2003), previamente ha evaluado esta técnica sobre todo en el impacto que ha tenido entre los productores. Los resultados demuestran que se ha tenido buena aceptación por estos programas pero una gran desilusión debido a la falta de continuidad, ya que los programas subsidiados tienen gran aceptación por productores pero cuando ellos tienen que cubrir todos los gastos, el entusiasmo disminuye.

Con base a lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de implementar un programa económicamente rentable de transferencia de embriones con productores del estado de Tabasco

IV.- REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Transferencia de embriones

Existen herramientas reproductivas como la inseminación artificial (IA) y la transferencia de embriones (TE) que se implementan con la finalidad de mejorar genética y productivamente los hatos ganaderos (Butler y Biggers 1989), sin embargo, existen grandes diferencias entre cada una de estas técnicas, ya que con el uso de la IA tendrían que pasar varios años para obtener resultados en cuestión de progreso genético del hato (Seidel, 1981), al contrario de la TE en la que se obtienen resultados en un intervalo de tiempo relativamente corto (Christensen, 1991), por lo que ésta sería la mejor opción después de la IA (Lohuis 1995). El principal uso de la TE es ampliar los porcentajes reproductivos de animales con alto valor, su uso es principalmente en ganado, ya que en estos animales los porcentajes reproductivos son bajos y el intervalo generacional es largo (Seidel, 1991).

La TE a través del cérvix en bovinos comenzó a ser utilizada en trabajos experimentales a finales de los años 40. Dificultades de distinta índole que se presentaron en el desarrollo del método hicieron que la técnica tuviera éxito con el nacimiento del primer becerro hasta el año 1964 (Mutter *et al.*, 1964). En las últimas décadas los porcentajes de preñez se han incrementado de manera significativa posibilitando actualmente obtener porcentajes de hasta 60%, aun con la TE congelados (Cutini *et al.*, 1999).

La transferencia embrionaria se desarrolló en sus inicios con la finalidad de optimizar los recursos genéticos y económicos de los hatos, en la actualidad existe la tendencia a llevar a cabo producciones masivas de embriones, de esta manera las vacas de alto valor genético, productivo y comercial pueden producir en promedio de 10 a 15 crías por año, lo cual impulsa el mejoramiento genético de los hatos ganadero. Sin embargo, a pesar de los avances para mejorar la efectividad de la técnica y aumentar con esta el porcentaje de gestación, esta técnica no ha dado los mismos resultados en regiones tropicales como en zonas

templadas, ya que las características del trópico como lo son las variaciones en la temperatura, humedad, alimentación y manejo de los sistemas productivos son muy diferentes entre sí, lo que conlleva a una variación muy amplia en la respuesta superovulatoria de las donadoras, lo que resulta en un alto porcentaje de embriones con características indeseables y un mal desarrollo (Kafi y McGowan, 1997)

4.2 Ovulación múltiple

La transferencia de embriones cobra cada día mayor importancia en el área de reproducción. En los últimos años se han conseguido superar muchas barreras en determinados aspectos relacionados con el éxito en la utilización de esta técnica, como son los métodos de colección, evaluación y transferencia de los embriones, sin embargo uno de los campos en que no se ha avanzado mucho ha sido el del momento óptimo para iniciar el tratamiento de ovulación múltiple, con el fin de conseguir que un número mayor de animales tengan una respuesta más uniforme a esta. Respecto al momento de inicio del tratamiento, se ha comprobado la determinante influencia que tiene la presencia de un folículo dominante en la respuesta a la ovulación múltiple, ya que es mayor cuando el folículo no tiene capacidad de dominancia funcional sobre el resto de los folículos susceptibles a responder a hormonas exógenas al momento de iniciar el proceso de ovulación múltiple. (Bungartz y Nieman, 1994; Fricke *et al.*, 1994). El comportamiento entre las oleadas foliculares dentro de un ciclo estral es muy diferente entre todas las hembras, al igual que lo que ocurre en una misma vaca. Sin embargo, en la mayoría de los casos la atresia del primer folículo dominante y el inicio del crecimiento del segundo se produce entre el día 8 y 12 después de la ovulación en los ciclos estrales con dos oleadas foliculares, además se puede tomar como un promedio un día antes de los mencionados para animales con tres oleadas (Ginther *et al.*, 1989).

Cabe suponer, que es más fácil que se encuentre presente un folículo funcionalmente dominante cuando se inicia el tratamiento de ovulación múltiple en

el día 8 del ciclo que en el día 12. Si bien muchos autores no hacen referencia a diferencias en la respuesta entre los distintos días de inicio del tratamiento (en el intervalo de los días 8 a 14 del ciclo estral), parece que sí existe una cierta tendencia a que aumente la tasa de ovulación cuanto más tarde se empiece el tratamiento (Staigmiller *et al.*, 1992) y a que los resultados sean superiores en el día 12 en términos de número de embriones transferibles recolectados (De Ruigh *et al.*, 2003). Lindsell *et al.*, (1986), ha situado la mejor respuesta al iniciar el tratamiento en el día 9, sin embargo, la mayoría ha observado un incremento en los resultados a partir del día 10 (Lerner *et al.*, 1986; Goulding *et al.*, 1990; Staigmiller *et al.*, 1992).

La necesidad de incrementar el número de hijos por donadora, ha forzado anular los mecanismos biológicos en la reproducción implementado la técnica de MOET (Ovulación múltiple y transferencia de embriones); el objetivo de esta en vacas es obtener un máximo número de embriones fertilizados y transferibles con una alta probabilidad de producir una gestación (Armstrong, 1993). Sin embargo, existen grandes diferencias en cuanto al tratamiento no solo entre especies bovinas sino entre animales de la misma especie y entre un mismo individuo, es por esto que la respuesta al tratamiento es muy variable, el mayor problema que existe en la variabilidad a la respuesta superovulatoria se da dependiendo el desarrollo de los folículos al momento de iniciar el programa, ya que es muy difícil predecir el inicio de la oleada folicular.

Esta técnica puede afectar la calidad embrionaria, ya que estos embriones provienen de una esteroidogénesis folicular anormal, provocando maduración prematura y ovocitos no competentes para su desarrollo (Foote y Ellington, 1998).

En un ciclo natural después de la fertilización, aproximadamente el 80% de los ovocitos ovulados llegan a estados de embrión; y después de la ovulación múltiple el 60% de ellos se desarrollan hasta blastocisto (Merton, 2003).

La diferencia de calidad entre los embriones, se puede deber a una respuesta de ovulación múltiple alta, incrementando la producción de embriones de mala calidad (Greve *et al.*, 1995), mostrando los *Bos indicus* una gran sensibilidad a las gonadotropinas, reclutando más folículos en una onda folicular que los *Bos taurus*, obteniendo una mayor respuesta a la ovulación múltiple (Baruselli *et al.*, 2006).

Una dosis elevada de gonadotropinas produce una sobre estimulación ovárica donde muchos folículos comienzan a desarrollar pero pocos son capaces de ovular y la mayoría sufre luteinización o se atresian. Además Baruselli *et al.* (2006), observaron que al aumentar la edad de la donante disminuyeron el número de ovulaciones, la tasa de fecundación y la calidad embrionaria. La disminución en el número de ovulaciones se debería a una menor disponibilidad de folículos capaces de responder a gonadotropinas exógenas. Al existir menos folículos en crecimiento, los niveles de inhibina bajan y aumenta la FSH endógena que haría que en estos animales, en cualquier momento del ciclo estral los folículos en crecimiento estuvieran en un estado de desarrollo más avanzado que aquellos folículos en los animales más jóvenes. Al comenzar el tratamiento con gonadotropinas, los folículos más maduros serían los primeros en producir grandes cantidades de estrógenos. Por lo tanto, los ovocitos dentro de estos folículos, estarían expuestos a altas concentraciones de estrógenos por largos periodos antes de la ovulación; comparándolos con los ovocitos dentro de los folículos menos desarrollados. Esta exposición a una alta concentración de estradiol podría ser la causa de la disminución en la tasa de fertilización y en la calidad embrionaria (Lerner *et al.*; 1986).

4.3 Métodos de recolección de embriones

4.3.1 Métodos quirúrgicos

La TE en bovinos, aproximadamente hace dos décadas, se realizaba mediante técnicas quirúrgicas, la cual requería de anestesia general, inducida por medio de

barbitúricos y mantenida por medio de inhalación, ésta se realizaba mediante una incisión de 15 centímetros de longitud en la línea media, por delante de la glándula mamaria, se extraían los cuernos uterinos con los ovarios, la infusión de los cuernos y los oviductos se realizaba entre los días 5 y 7 del ciclo estral, introduciendo catéteres de goma a través de la pared dorsal del cuerno uterino y en la ampolla del oviducto, sin embargo, con el afán de hacer más funcional y practica la técnica, Surgie *et al.*, (1972), realizaron la recolección de los embriones por vía transcervical, evitando con esto, posibles adherencias del útero, debido al procedimiento quirúrgico que se utilizaba.

4.3.2 Métodos no quirúrgicos

La posibilidad de realizar la recolección de los embriones por vía transcervical, abrió una nueva ventaja a la técnica, simplificando con esto su procedimiento y así disminuir el trauma uterino, para ello, se probó con diferentes tipos de catéteres, entre los cuales se utilizaron los rígidos (Surgie *et al.*, 1972), semirígidos (Rasbech, 1976) y flexibles (Drost, 1976; Newcomb *et al.*, 1978; Hahn, 1978). Así mismo, estos pueden tener dos vías, las cuales una es para inflar un globo para inmovilizar el catéter dentro del útero y la otra para introducir y recolectar el medio de colección del útero con los embriones. Rasbech (1976), desarrolló un sistema semirígido para recolección de los embriones, con el cual a partir de una sonda Folley de dos vías, en el cual introducía entre 12 y 15 ml de aire en el globo e introducía el medio con la ayuda de una jeringa de 60 ml, se obtuvo una relación entre el número de cuerpos lúteos encontrados en cada ovario con el número de embriones recolectados por cuerno uterino que oscilaba entre el 57 y 100%. Además una relación entre el medio introducido y recolectado del 86-100%. Con estos resultados se indica el éxito de la técnica propuesta, la cual constituyó el punto de partida de los catéteres flexibles de dos vías, empleados actualmente. Sin embargo al mismo tiempo de utilizar este tipo de catéter, algunos investigadores han tratado de facilitar la recolección de los embriones llegando a utilizar catéteres de tres vías, los cuales tienen la ventaja que una vía permite

inyectar el medio hacia el interior del útero mientras que la otra conduce el líquido hacia fuera de este y una última vía sirve para fijar el catéter al útero. En la actualidad se emplean catéteres rígidos y flexibles de 2 y 3 vías, además de existir 3 métodos de recuperación de los embriones (Palma *et al.*, 1991): 1^o : Circuito cerrado con flujo continuo: con este método (Elsden, 1976; Greve *et al.*, 1977) se emplearon catéteres de 3 vías, rígidos (Cassou, 1984) o flexibles (Brand *et al.*, 1978), una vía destinada a la inyección del medio de recolección, se conecta al depósito del medio. La solución puede entrar al útero por gravedad colocando el frasco con el medio a aproximadamente un metro sobre el filtro de los embriones o bien se puede introducir con una jeringa, por la segunda vía del catéter, se inyecta medio o aire para inflar el globo del mismo y de este modo fijarlo al útero, por último por la tercera vía se recolecta la solución introducida al útero con la finalidad de extraer los embriones, la cual debe estar conectada a un filtro de recolección. 2^o: circuito cerrado con flujo discontinuo: con este método se utiliza un catéter de 2 vías, una jeringa de 50-60ml o un contenedor del medio, una manguera bifurcada con válvulas de control de entrada y salida de medio y un filtro recolector de embriones. El catéter es introducido hasta el útero de la vaca, una vez colocado en la entrada de un cuerno o en el cuerpo del útero se infla el globo del catéter para fijarlo y proceder al llenado de los cuernos con el medio de lavado el cual entra por gravedad, una vez llenados semejando una gestación de 45 días se cierra la válvula de llenado y se procede a dar un suave masaje a los cuernos para desprender los embriones que pudieran estar pegados a la pared uterina, posteriormente se abre la válvula de salida del medio con los embriones los cuales caen al filtro recolector; este procedimiento se puede repetir 10 veces aproximadamente, aunque en los primeros 3 lavados salen el 80% de los embriones y 3^o: circuito abierto con flujo discontinuo: esta técnica se emplea con los catéteres flexibles de dos vías u no se requiere de mangueras o conexiones extras, el medio se inyecta y recolecta por la misma vía con la misma jeringa, con ésta se descarga un volumen el cual se determina palpando los cuernos uterinos al momento de llenarlos con medio, para evitar desgarrar la pared uterina al excederse de medio introducido. Algunos autores recomiendan fijar y dar un suave

masaje al útero durante la inyección del medio, esta operación es particularmente importante cuando el animal no está fijado con una elevación del tren anterior, para facilitar el retorno del medio de lavado (Palma, 1998).

Cuando la donadora es fijada con una elevación anterior algunos operadores no manipulan los cuernos uterinos, solo verifican el llenado por primera vez y posteriormente retiran el brazo del recto y continúan con la inyección de medio hasta completar el volumen establecido de medio. La recolección de los embriones en esta posición, facilita la infusión y colección en vacas con múltiples pariciones, aun cuando se empleó el masaje del útero. Este método es aplicado en centros de transferencia de embriones donde ya se cuenta con la infraestructura necesaria, presenta la ventaja que la manipulación no irrita al animal y facilita la operación, mientras se descarga el medio recuperado del útero en una caja de petri cuadrículada el catéter debe ser cerrado con una pinza hemostática o un clamp.

4.4 Transferencia de los embriones

El desarrollo de la TE fue paralelo al de la recolección, es decir, cuando los embriones eran recolectados 5-7 días después del estro por medio de cirugía y bajo anestesia general, las receptoras eran preparadas para la transferencia bajo las mismas condiciones que las donadoras.

En un esfuerzo por eliminar los problemas asociados con la anestesia general, sin alterar la eficacia de la recolección quirúrgica, algunos grupos cambiaron hacia el uso de la anestesia local. Esta variante fue aplicada inmediatamente a las receptoras y su empleo exitoso permitió que se siga utilizando en la práctica, ya sea mediante métodos quirúrgicos y no quirúrgicos.

4.4.1 Transferencia Quirúrgica

La primera transferencia quirúrgica con éxito en bovinos fue lograda por Willet *et al.*, (1951), quienes practicaron la cirugía bajo anestesia general, con el animal en posición decúbito dorsal y por la línea media. El cuerno ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo era expuesto sobre el campo operatorio para ser punzado, una pipeta de vidrio (conteniendo el embrión) era introducida a través del punto de punción y el embrión depositado en el lumen uterino, en un volumen mínimo de medio (0.2ml). Avery *et al.*, (1962), simplificaron la técnica quirúrgica transfiriendo los embriones a la receptora en pie y por el flanco, a fin de determinar *a priori* que cuerno era ipsilateral a la ovulación, se procedió a la palpación diagnóstica de las receptoras, la elección del flanco a incidir lo determinaba el ovario ovulado; esta laparotomía lateral en la actualidad dejó de usarse, la anestesia local fue complementada con una paravertebral, la transferencia era practicada a través del borde dorsal en el tercio anterior del cuerno, el embrión era transferido con una pipeta Pasteur o pajilla plástica (0.25 – 0.50 ml); la sutura se practicaba según los métodos de rutina. Las preñeces con esta técnica variaban entre 70 y 80%, con embriones frescos (Baker *et al.*, 1984; Takeda *et al.*, 1986) y aproximadamente 10% menos con embriones congelados, siempre en condiciones óptimas. Una variante menos quirúrgica ensayada fue la extracción del cuerno uterino por el fondo de la vagina, se practicó una incisión con un bisturí oculto en la pared dorsal del fondo de la vagina entre su pared dorsal y el cérvix, se empujaba este hacia abajo antes de punzar para evitar lesionar el recto, a través de la incisión se extraía el cuerno uterino, llevándose a cabo la deposición del embrión. Los problemas de esta técnica fueron: la buena experiencia previa necesaria, la dificultad de exteriorizar el cuerno uterino sin causar traumas en el tracto genital, especialmente en vaquillonas, vacas muy grandes y gordas (Elsden y Seidel, 1990) y la aparición de una nueva técnica, solo unos centímetros de diferencia con la técnica de inseminación artificial, es decir, transferencia no quirúrgica.

4.4.2 Transferencia no quirúrgica

Es la técnica de elección en la actualidad, la primera transferencia de embriones no quirúrgica con éxito en bovinos fue lograda por Mutter *et al.* (1964), atravesando el cérvix con una pipeta de inseminación. El éxito fué precedido, sin embargo, de muchos fracasos como consecuencia, aparentemente de infecciones y contracciones uterinas provocadas en el intento, debido a la inexperiencia en la manipulación del útero. Los recipientes para los embriones y los instrumentos empleados en la transferencia son de diverso material y tamaño. En la actualidad los catéteres de transferencia están adaptados a pajillas de 0.25 ml y 13 cm de largo, que sirven como envases para los embriones, estos pueden ser metálicos o de plástico, los catéteres metálicos son de acero inoxidable, su punta atraumática posee un orificio lateral, por donde es expulsado el embrión. El tubo del catéter está dividido en dos partes unidas a rosca, a fin de introducir la pajilla en su interior. La rigidez de este catéter permite introducirlo más fácilmente a través del cérvix de vaquillas que los de plástico, porque actúa simultáneamente como dilatador. Los de plástico son más finos que los metálicos, debido a su flexibilidad y son de elección para la transferencia de embriones en vacas multíparas, vienen envasados en forma individual, estériles y desechables.

Al comienzo del los 80's se estableció como el lugar óptimo para la transferencia quirúrgica del embrión el tercio anterior del cuerno uterino (Newcomb y Rowson, 1980) basado en que los embriones del día 7-8 se localizan en el útero a 5-6 cm. de la unión útero-tubárica (Strawberger, 1982). Esto no es posible en la transferencia no quirúrgica con un catéter rígido, como consecuencia de la curvatura uterina (Newcomb, 1982). Estudios posteriores no encontraron diferencias en el éxito de la transferencia comparando el tercio anterior con el medio y estimaron que el intento de transferir los embriones por delante del tercio medio con un catéter rígido podía conducir a traumatismos de la mucosa uterina con muerte embrionaria (Sreenan y Diskin, 1987), es por esto que el lugar de elección para obtener resultados aceptables es por delante del ligamento interconual (West y Donaldson, 1984).

4.5 Métodos de preservación

4.5.1 Refrigeración

Debido a la problemática que se tiene en la variabilidad a la respuesta ovulación múltiple, al obtener en ocasiones, una cantidad de embriones transferibles superior al número de receptoras preparadas al momento de la recolección, surgió el interés por tratar de conservar viables embriones de buena calidad, que al momento de la transferencia no pudieron ser transferidos por falta de receptoras, asincronía donadora-receptora o distancias muy largas entre donadora y receptora, debido a esto Leibo y Winninger (1986) y Refsdal *et al.*, (1988), evaluaron la preservación de los embriones mantenidos en refrigeración, con la cual se mantienen a temperaturas entre 0 y 4°C durante 24 a 72 h, sin que se afecte con esto su viabilidad y ayudando a alcanzar la sincronía necesaria para realizar la transferencia. Esta técnica se encuentra en un paso intermedio entre la transferencia de embriones en fresco (recién recolectados) y conservados a -196° C., es una técnica que permite detener el desarrollo embrionario y mantener la viabilidad embrionaria mediante un simple refrigerador con hielo y agua para regular el descenso de la temperatura.

Diversos investigadores han mantenido en distintas duraciones de almacenamiento en refrigeración a los embriones en las cuales Refsdal *et al.*, (1988) obtuvieron porcentajes de preñez del 47%, Bezugly *et al.*, (1988) encontraron un 50% de preñez y Linder y Ellis, (1985) obtuvieron porcentajes de preñez del 44%, en un periodo de 24, 48 y 72 horas, respectivamente.

No obstante, a pesar de los buenos resultados obtenidos y su sencillez, en la actualidad ha caído en desuso debido a que la congelación convencional se ha convertido en una técnica que si bien es más costosa, permite mantener la viabilidad embrionaria por tiempo ilimitado, con las ventajas prácticas que ello trae como consecuencia.

4.5.2 Métodos de congelamiento

La criopreservación posibilita almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos. En el caso particular de los bovinos, cuyos embriones son recolectados mediante métodos no quirúrgicos, las ventajas que brinda la criopreservación se ven reflejadas en la realización de un programa de transferencia de embriones y con mayor auge en el comercio nacional e internacional de animales. En el desarrollo de programas de transferencia de embriones, la criopreservación permite utilizar eficientemente donadoras y receptoras de embriones, ayudando con esto a tener una mayor disponibilidad de las últimas. Con esto también se posibilita transferir algunos embriones y conservar el resto en bancos de germoplasma. Con respecto a la comercialización, la criopreservación permite a los ganaderos progresar genéticamente además de hacer posible controlar enfermedades, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones criopreservados libre de ellas.

La conservación a menos 196° C permite mantener embriones por periodos extensos. Leibo, (1989), identifica cuatro etapas comunes a las diferentes técnicas: 1) exposición de los embriones a concentraciones molares de agentes crioprotectores, 2) enfriamiento desde temperaturas fisiológicas hasta temperaturas lo suficientemente bajas como para causar un virtual cese de todas las reacciones químicas inducidas térmicamente, 3) calentamiento desde la temperatura de conservación a temperaturas fisiológicas y por último, 4) extracción del crioprotector. En la congelación convencional, los embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura, y lo mantienen durante el enfriamiento. Éste, se lleva a cabo lentamente permitiéndole a los embriones contraerse y ceder agua, en respuesta al incremento gradual de la concentración extracelular. Se han desarrollado otras técnicas en las que se efectúa una deshidratación parcial de los embriones sin que estos alcancen su equilibrio osmótico.

4.5.3 Congelación convencional

Esta técnica, es un proceso físico-químico complejo, en el cual se lleva a cabo un intercambio de calor y agua entre las células y el medio externo que resulta en un cambio de fase líquida a sólida (Aller *et al.*, 1995). Los embriones son congelados y descongelados de manera rápida. Esto hace necesario deshidratarlos parcialmente antes de la congelación con el fin de evitar la formación de cristales que lesionan los blastómeros (Mazur, 1977). La deshidratación parcial de los embriones se logra incorporando una sustancia crioprotectora al medio de congelación (Schneider y Mazur, 1986).

Los crioprotectores son sustancias de bajo peso molecular que pueden o no penetrar la membrana plasmática. Si bien cada crioprotector tiene mecanismos propios de acción, sus efectos generales son estabilizar las membranas celulares, producir la salida de agua intracelular y reducir la concentración de electrolitos del medio extracelular.

La respuesta celular a temperaturas debajo de 0°C depende de la tasa de enfriamiento a la que son sometidas las células. Cuando se utilizan tasas de enfriamiento muy lentas, se produce lo que se conoce como efecto de solución, ya que al iniciarse el descenso de la temperatura, comienza a formarse hielo en la solución extracelular, con la consecuente concentración de sales. Los blastómeros ceden agua produciéndose una deshidratación excesiva de los mismos que ocasiona la disminución del volumen celular y la destrucción de la membrana plasmática. Por el contrario, si la tasa de enfriamiento es excesivamente rápida, el agua no alcanza a salir del interior de las células, produciéndose cristales de hielo intracelulares. Si la descongelación posterior es lenta, estos cristales sufren un crecimiento adicional, provocando un daño mecánico que compromete la vida celular.

Las soluciones de congelación pueden enfriarse por debajo de su punto de congelación. Al llegar a -10 o -15° C se forma hielo de manera espontánea, produciéndose un aumento brusco de temperatura denominado calor latente de fusión. Para evitar que esto suceda, se realiza entre -4 y -7° C, una inducción a la formación de hielo en el medio extracelular, el descenso controlado de la temperatura continua hasta alcanzar temperaturas de entre -30 y -40° C momento en el cual ya no se producen mas cambios de volumen y así poderlos sumergir en nitrógeno líquido a -196° C (Lehen-Jensen y Greve, 1982).

La temperatura a la que se detiene la congelación y se sumergen en nitrógeno líquido determina la velocidad de descongelación, inmediatamente posterior a la descongelación, el crioprotector debe ser retirado del embrión para evitar un shock osmótico. El resultado de la congelación esta condicionado por la calidad del embrión, por el tiempo que transcurre desde la recolección hasta que comienza la congelación y por el estado de desarrollo embrionario.

Los porcentajes de preñez que se obtienen luego de transferir embriones de calidad excelente pueden diferir de los de buena calidad, con ambas calidades se obtienen mejores resultados que con aquellos de calidad regular (Leibo, 1986; Arreseigor *et al.*, 1998; Munar *et al.*, 1998). Con respecto a esto, estos autores han realizado estudios en los cuales han encontrado porcentajes de preñez que oscilan entre 24 a 39%, 44 a 53% y 48 a 61% para embriones de regular, buena y excelente calidad, respectivamente.

Por su parte, los porcentajes de preñez resultantes de la transferencia de embriones congelados son inversamente proporcionales al tiempo transcurrido desde la recolección hasta el comienzo de la congelación (Wright, 1985). La viabilidad embrionaria disminuye significativamente cuando dicho periodo es mayor de 3 h (Pettit, 1985).

Con relación al estado de desarrollo, algunos autores han obtenido mayores resultados con mórulas compactas y blastocistos tempranos que con blastocistos medios y/o expandidos. (Dochi *et al.*, 1998; Munar *et al.*, 1998). Según estos autores, los estadios más avanzados serían más sensibles a la congelación por tener un grado mayor de diferenciación celular y presencia de líquido en el blastocelo. A su vez se observó un mayor efecto del estadio cuando se utilizó etilenglicol con respecto al glicerol (Palma *et al.*, 1998). Contrario a esto, Prather *et al.*, (1987) sostienen que los estadios de desarrollo más avanzados son los que presentan mejor viabilidad post-descongelación, ya que en el desarrollo avanzado implica un grado inherente de viabilidad lo que les ayuda a estos embriones a sufrir una menor degeneración celular. Por último es importante señalar, que en un número importante de trabajos no se han observado diferencias con la congelación de los estadios comprendidos entre mórula compacta y blastocisto expandido (Leibo, 1982; Pettit, 1985; Wright 1985; Nibart, 1986).

4.5.4 Método Estándar

Wilmot y Rowson (1973), llevaron a cabo la producción del primer becerro nacido por transferencia de un embrión congelado. Debido a la complejidad del proceso a partir de esta fecha se le han hecho modificaciones con la finalidad de simplificarlo (Cabodevila *et al.*, 1991). Crioprotectores, velocidades de enfriamiento, congelación, descongelación y técnicas de extracción del crioprotector han sido los aspectos sobre los que se están desarrollando estudios.

Con respecto a los crioprotectores, luego de utilizar 1,2 propanodiol (Renard *et al.*, 1981), etilenglicol y mezclas de DMSO y glicerol (Elsden *et al.*, 1982) generalmente se eligió al glicerol como crioprotector, especialmente luego de que Bouyssou y Chupin (1982) obtuvieron mejores resultados con 1,4 M de glicerol que con 1,5 M de DMSO. La utilización de glicerol simplificó la técnica y a partir de ese momento se comenzó a realizar la congelación en una sola etapa (Bui-Xuan-Nguyen *et al.*, 1984; Chupin y Procureur, 1984; Niemann, 1985).

Martínez *et al.*, (2002) compararon la adición del glicerol en una sola etapa de 5 minutos de duración con dos etapas de 5 minutos cada una. Los porcentajes de preñez resultaron similares: 39.1 y 40.4% respectivamente. No obstante la adición en dos etapas afectó significativamente la preñez obtenida con blastocistos respecto a mórulas, 20 y 59%, respectivamente. Teniendo en cuenta el menor tamaño y relación superficie / volumen de las células de los blastocistos, se especuló que el periodo de exposición al glicerol de 10 minutos resulto excesivo.

De acuerdo a los cambios efectuados en las velocidades de enfriamiento, congelación y descongelación, una de las primeras modificaciones fue hecha por Willadsen (1977) en la cual en su estudio demostró que los embriones sobrevivían cuando la congelación lenta se detenía a -30°C o -40°C , se depositaban en nitrógeno líquido y se descongelaban de manera rápida en agua a 25°C durante 20 segundos. Con esto se logró reducir el tiempo de congelación a la mitad. Una mayor simplificación se logró cuando Bouyssou y Chupin, (1982) y Schneider y Mazur, (1984) demostraron que los embriones podían ser colocados en el equipo de congelación directamente a la temperatura a la que se induce la cristalización, sin importar la velocidad de enfriamiento.

El momento de detención de la congelación lenta debe estar en función de la concentración del crioprotector (Takeda *et al.*, 1985; Massip *et al.*, 1987). Generalmente entre -20 y -30°C , no se registran diferencias importantes en la viabilidad post-descongelación (Lehn-Jensen *et al.*, 1981). Algunos autores recomiendan un segundo periodo de congelación más lento aun, $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre -35 y -38°C (Lindner *et al.*, 1982; Pettit, 1985), mientras que otros prefieren un periodo de estabilización de aproximadamente 15 minutos antes de pasar a la congelación rápida hasta -196°C (Wright, 1985).

Con respecto a la técnica de extracción del crioprotector una vez retirados los embriones de la pajilla, Leibo y Mazur (1978), sugirieron un procedimiento alternativo

a la técnica de extracción escalonada para retirar el crioprotector de los embriones, utilizaron una concentración isoosmolar de sucrosa. Este carbohidrato no penetra en los blastómeros y como consecuencia, el glicerol sale del embrión mas rápido que cuando se realiza de manera escalonada.

Algunos investigadores han realizado la extracción del crioprotector con sucrosa con distintas molaridades, sin que esto afecte la viabilidad embrionaria (Tervit y Elsden, 1981; Renard *et al.*, 1983; Tekada *et al.*, 1985; Prather *et al.*, 1987). A su vez Niemann *et al.*, (1982); Niemann, (1985) y Munar *et al.*, (1988), expusieron a los embriones inmediatamente después de la descongelación a una mezcla de glicerol y sucrosa y luego a una solución únicamente de sucrosa sin encontrar diferencias en la viabilidad de los embriones. Sin embargo, aunque con estos trabajos los porcentajes de preñez oscilan entre un 47% encontrado por Dochi *et al.*, (1998) hasta un 62% encontrado por Munar *et al.*, (1998), desde el momento en que se demostró que la sucrosa se puede utilizar para retirar el crioprotector de los embriones (Leibo y Mazur, 1978), surgió la posibilidad de diseñar una técnica de extracción del glicerol que se adaptará al trabajo en condiciones de campo, es por esto que Leibo (1982) y Renard *et al.*, (1982), estandarizaron un método llamado “one step”.

4.5.5 Método “one step”

Con este método se evita que los embriones estén en contacto con el medio externo al momento de la extracción del crioprotector, además de realizar la transferencia embrionaria a nivel de campo sin requerir de equipos ni de un laboratorio; no obstante, al prescindir de la evaluación morfológica después de la descongelación es de esperarse que los resultados de preñeces sean inferiores a otros métodos de congelamiento. Para llevar a cabo el congelamiento mediante este método, el embrión es ubicado en la parte media de la pajilla utilizando etilenglicol como crioprotector, separado de los extremos que contienen sucrosa

en concentración isoosmolar por burbujas de aire (Leibo, 1982) o sucrosa en el segmento inferior y medio B2 de Menezo en el superior (Renard *et al.*, 1982).

Al efectuar la descongelación, las soluciones se mezclan agitando la pajilla para desplazar el aire hacia los extremos y permitir que las soluciones se mezclen. La solución de sucrosa isoosmolar con el medio de congelación provoca que el etilenglicol salga del embrión, de esta manera se extrae el crioprotector dentro del envase de congelación. Chupin *et al.*, (1984) compararon los resultados de preñeces obtenidos con las metodologías de Leibo (1982) y Renard *et al.*, (1982), sin encontrar diferencias significativas; sin embargo hubo una tendencia a mayor porcentaje de preñez 44.7% para la técnica de Renard *et al.*, (1982) contra 38.5% de la propuesta por Leibo (1982).

Este método representa una gran ventaja práctica debido a que posibilita transferir embriones congelados a campo de manera similar a lo que ocurre con la inseminación artificial. No obstante, cuando el glicerol es extraído dentro de la pajilla, la viabilidad embrionaria puede ser afectada si no se logra una mezcla homogénea de las diferentes soluciones.

Los porcentajes de preñez que se logran con el método one step oscilan entre 25% y 40% encontrándose en esta una gran variabilidad. Considerando los inconvenientes de este método, surgió la necesidad de encontrar nuevas alternativas para la transferencia a nivel de campo, con lo que surge la llamada transferencia directa.

4.5.6 Transferencia directa

Este método permite descongelar el embrión y transferirlo prescindiendo de la extracción del crioprotector. Con este método el embrión es expuesto a una solución de glicerol y sucrosa previo a la congelación, con esto se provoca una deshidratación extrema del mismo con una reducción en su volumen de alrededor

del 40% al final del periodo de estabilización, lo que evita el shock osmótico post-descongelación (Massip *et al.*, 1987). En consecuencia, en estos embriones la congelación lenta puede ser detenida antes (a -25°C) dado que no hay riesgos de formación de cristales durante la congelación rápida. La sucrosa esta involucrada en el transporte activo de iones, mecanismo que es controlado por el sistema $\text{Na}+\text{K}+\text{ATPasa}$, el que es inhibido por el glicerol. Por lo tanto, se considera que la presencia de sucrosa en el medio de congelación permitiría a los embriones, reestablecer el potencial de equilibrio químico durante la descongelación. Además, la sucrosa, al igual que otros carbohidratos, preserva la integridad estructural y funcional de las membranas. Otra variante importante en este método es el que se reemplaza el glicerol por etilenglicol, crioprotector que tiene menor peso molecular que el glicerol y por lo tanto, resulta más permeable con lo que provoca pequeños cambios de volumen celular. Al momento de envasar el embrión, se incluyen dos columnas de solución buffer fosfato suplementada con suero o albúmina sérica (PBSS) en la pajilla para facilitar la remoción del etilenglicol desde el embrión y disminuir la cantidad de crioprotector transferida al útero de la receptora, permitiendo reducir efectos locales en el ambiente uterino (Voelkel y Hu, 1992).

El método de transferencia directa en el que se utiliza etilenglicol ha dado resultados muy satisfactorios con porcentajes de preñez similares a los obtenidos con el método estándar (Beal *et al.*, 1998; Palma *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2002), se obtuvieron mejores resultados con mórulas compactas y blastocistos tempranos que con blastocistos y blastocistos expandidos (Dochi *et al.*, 1998; Munar *et al.*, 1998). Suponiendo que ello se deba a que los embriones de mayor número de células tenían mayor permeabilidad relativa, se redujo el periodo de estabilización y se incorporó sucrosa a la solución de etilenglicol. Con ello mejoró el porcentaje obtenido con los estadios avanzados (Munar *et al.*, 1998). Martínez *et al.*, (2002) compararon la utilización de etilenglicol y propilenglicol, ambos a una concentración 1.5M suplementados con sucrosa (0; 0.1 ó 0.3 M). Concluyeron que el etilenglicol continúa siendo el crioprotector de elección para el método de transferencia directa y que su suplementación con una concentración 0.1 M de

sucrosa resulta benéfica. Sin embargo, aunque los porcentajes de preñez siguen siendo similares, cada día se estudia la posibilidad de dañar lo menos posible al embrión al momento de la congelación, debido a esto surgió la técnica de vitrificación, que aunque desde hace varios años se emplea en la conservación de células tejidos y órganos en el empleo de conservación de embriones y ovocitos es un poco más reciente (Rall y Fahy, 1985; Nakagata, 1989).

4.5.7 Vitrificación

La vitrificación es un proceso termodinámico mediante el cual un fluido incrementa su viscosidad durante el enfriamiento, adquiriendo propiedades de un sólido (Bautista y Kanagawa, 1998). A diferencia de lo que ocurre durante la congelación, en la vitrificación no se forman cristales sino que el fluido pasa a un estado sólido no estructurado similar al vidrio de donde la técnica toma su denominación. En condiciones prácticas, la vitrificación se logra mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido. Esto representa una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 2500 °C/minuto, resultando necesario el empleo de soluciones altamente concentradas de uno o más crioprotectores permeables que pueden ser tóxicas para las células (Palasz y Mapletoft, 1996).

Massip *et al.*, (1987), lograron el nacimiento del primer becerro producto de la transferencia de un embrión vitrificado. El protocolo original resultó apto para vitrificar mórulas compactas y blastocistos tempranos pero no blastocistos. Prueba de ello es que se obtuvieron 16 preñeces luego de la transferencia de 42 mórulas compactas y blastocistos tempranos (38.1%) y ninguna después de la transferencia de 13 blastocistos (Massip *et al.*, 1998). El mismo grupo de investigadores logró poco tiempo después, vitrificar con éxito blastocistos, modificando el protocolo original. El periodo de exposición de los embriones al medio de vitrificación intracelular fue duplicado y los embriones expuestos a soluciones de glicerol, glicerol y sucrosa en PBSS antes de tomar contacto con el medio de vitrificación extracelular enfriado a 4 °C. De esta manera, se redujo la

entrada de 1-2 propanodiol a los blastocistos y con ello, la toxicidad del medio de vitrificación. Con este trabajo quedó demostrada una interacción entre el estadio de desarrollo y protocolo utilizado dado que, la variante introducida resultó adecuada para vitrificar blastocistos pero no estadios mas tempranos (Van der Zwalmen *et al.*, 1989). Una nueva técnica de vitrificación es la OPS (Open Pulled Straw), la cual es capaz de descender la temperatura a una velocidad de 20,000°C/minuto lo cual evita que los embriones tengan un mínimo contacto con el crioprotector utilizado, menos de 30 seg. para descender hasta -180 °C, con lo cual se evitaría un daño al embrión durante su congelamiento, es por esto que la vitrificación OPS ofrece una nueva alternativa con la cual se podrían solucionar algunos problemas simples de criopreservación de embriones lo que tendría un impacto practico en las biotecnologías reproductivas tanto de animales como en la reproducción asistida en humanos (Vajta *et al.*, 1998).

4.6 Factores que determinan el resultado de la transferencia de embriones

4.6.1 Embrión

A partir del desarrollo de la técnica de transferencia se observó que tanto la calidad de los embriones como el estadio de desarrollo y su edad podían afectar el resultado de la aplicación de la misma. Además de los factores propios del embrión, con el surgimiento de técnicas tales como la criopreservación, micromanipulación y más recientemente producción in Vitro de embriones, otros factores se fueron sumando a aquellos que modificaban los resultados de preñez.

Además, está demostrado que los resultados de preñez dependen no sólo de cada factor embrionario, sino de la interacción que pueda existir entre dos o más de ellos (Takeda *et al.*, 1986; Hasler *et al.*, 1995; Bredbacka, 1998).

La realización de una minuciosa evaluación de la calidad embrionaria es de fundamental importancia para el éxito de la transferencia. Es así que embriones

clasificados como excelentes o buenos tienen una alta probabilidad de alcanzar la preñez. No obstante, debe considerarse que embriones calificados excelentes luego de ser transferidos normalmente, no terminan en preñez, mientras que embriones transferidos con algún tipo de problema, resultan en preñeces y nacimientos normales (Elsden *et al.*, 1987). Este hecho nos indica que si bien la calidad embrionaria puede determinar los resultados obtenidos, otros factores relacionados con la receptora o con la transferencia podrían modificar dichos resultados.

Resulta difícil comparar la información publicada por distintos autores dado que se utilizan diferentes escalas para evaluar la calidad embrionaria. Hasta mediados de la década del 90, se utilizó principalmente una escala de 5 puntos, considerando a los embriones como excelentes, buenos, regulares, malos o degenerados. Actualmente muchos autores optan por la escala propuesta por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS por sus siglas en inglés) que agrupa los embriones según su calidad en 4 grados: excelentes y buenos, regulares, malos o degenerados.

Se ha reportado una mayor incidencia de muerte embrionaria cuando se transfieren embriones de mala calidad, que cuando los mismos son morfológicamente buenos (Markette *et al.*, 1985.). Por su parte, los resultados de preñez luego de transferir embriones congelados de calidad excelente pueden diferir de los de calidad buena. Con ambas calidades se obtienen mejores resultados que con aquellos de calidad regular (Leibo, 1986; Arreseigor *et al.*, 1998; Munar *et al.*, 1998).

El efecto que puede llegar a tener el estadio de desarrollo embrionario sobre los porcentajes de preñez es un factor que ha sido estudiado por diversos investigadores con resultados variables. En algunos casos, blastocistos tempranos resultaron en mayores porcentajes de preñez que mórulas, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados (Hasler *et al.*, 1987). Otros

autores, obtuvieron mejores resultados con blastocistos que con mórulas (Wright, 1981; Looney *et al.*, 1984; Donaldson, 1985); Dochi *et al.*, (1998), observaron que mórulas y blastocistos tempranos resultaron en porcentajes de preñez más elevados que blastocistos o blastocistos expandidos. Contrariamente, otros autores no han encontrado efecto del estadio de desarrollo (Lindner y Wright, 1983; Munar *et al.*, 1988).

Los porcentajes de preñez para embriones frescos producidos *in vivo* y transferidos en estado de mórula han sido muy variados oscilando entre 48 y 70%. Cuando los que se transfirieron han sido blastocistos, los porcentajes de preñez fueron del 65-70% (Wright, 1981; Hasler *et al.*, 1987; Munar *et al.*, 1988; Ellington, 1998). Para embriones producidos *in vivo* y congelados, los porcentajes de preñez fueron del 40% para mórulas y blastocistos tempranos, disminuyendo a un 27% para blastocistos y blastocistos expandidos (Dochi *et al.*, 1998). Para blastocistos eclosionados, se han obtenido resultados de preñez comparables a blastocistos tempranos y blastocistos (Donaldson, 1985; Munar *et al.*, 1988). Otros autores han obtenido menores porcentajes de preñez con este estadio y lo atribuyen a daños mecánicos durante la recolección, inadecuados sistemas de cultivo o a que sean menos viables por permanecer mayor tiempo en el útero de las donadoras inducidas a ovulación múltiple (Hasler *et al.*, 1987). Para embriones producidos *in vitro*, los mayores porcentajes de preñez (60%) resultaron con blastocistos tempranos, blastocistos y blastocistos eclosionados de 7 días de edad que a su vez fueron significativamente mayores que para los mismos estadios pero para una edad de 8 días, lo cual estaría indicando que la edad embrionaria sería lo determinante del éxito de la transferencia y no el estadio en sí (Hasler, 1995). Coincidentemente, Ling *et al.*, (1995), comunicaron mejores resultados de preñez cuando se transfirieron mórulas de día 5 a 6 y blastocistos de día 7 que blastocistos de día 6 y blastocistos expandidos de días 7 a 8 corroborando una interacción entre estos dos factores embrionarios. A su vez, resultados de preñez del 80% fueron comunicados por Takeda *et al.*, (1986), cuando se utilizaron embriones de alta calidad, independiente de que fueran mórulas, blastocistos

tempranos, blastocistos o blastocistos expandidos, confirmando la interacción del estadio de desarrollo con otro factor embrionario como es la calidad.

Muchos de los datos publicados sobre el efecto de la edad embrionaria y/o del estadio del desarrollo al momento de la transferencia sobre la tasa de supervivencia, derivan del análisis retrospectivo de transferencias, donde el factor edad se confunde con el grado de sincronía y el método de transferencia, entre otros. La mayoría de los embriones bovinos son recolectados y transferidos con una edad de 6 a 8 días y no queda claro si realmente hay un efecto de la edad en días o del estadio de desarrollo (Donaldson, 1986). A su vez, distintos estudios han mostrado que no hubo diferencias en los porcentajes de preñez luego de la transferencia de embriones de estas edades (Newcomb y Rowson, 1980; Shea, 1981; Wright, 1981). Por otro lado, la transferencia de embriones de 9 días o más, prácticamente no se realiza, pues es difícil encontrar los embriones en el medio de lavado luego que los mismos han perdido la zona pelúcida. No obstante cuando se realizaban transferencias con dichos embriones, los resultados fueron contradictorios y mientras algunos autores no encontraron disminución en los porcentajes de preñez (Newcomb y Rowson, 1980), otros observaron menores valores que cuando utilizaron aquellos de días 6 - 8 (Hasler *et al.*, 1987).

Los resultados de preñez luego de transferir embriones frescos producidos *in vitro*, de día 6 ó 7 no mostraron diferencias significativas, con valores de preñez al día 40 de gestación de 78 y 68% respectivamente (Agca *et al.*, 1998). Por su parte, Hasler *et al.*, (1995), habían comunicado resultados de preñez del 56% para embriones de día 7 y de 43 y 41% para aquellos de día 8 y 9 respectivamente, no obstante, la transferencia de embriones clasificados como excelentes y buenos ya sean de día 7 u 8 resultaron en mayores porcentajes de preñez que aquellos de calidad regular. Ling *et al.*, (1995) obtuvieron mayores porcentajes de preñez con mórulas de día 6 ó 7 y blastocistos de día 7 que con blastocistos de día 6 ó blastocistos expandidos de día 7 u 8 quedando demostrado una vez más la interacción entre factores embrionarios.

El efecto de la criopreservación de los embriones sobre los resultados de preñez es muy variado y ello se debe a que se producen interacciones con otros factores tales como la edad embrionaria, la calidad embrionaria y el estado de desarrollo y a su vez si los mismos han sido producidos *in vivo* o *in vitro*. Es importante considerar además que los porcentajes de preñez resultantes de la transferencia de embriones congelados son inversamente proporcionales al tiempo transcurrido desde la recolección hasta el comienzo de la congelación (Wright, 1985), dado que la viabilidad embrionaria disminuye significativamente cuando dicho período es mayor de 3 h (Pettit, 1985). A su vez, la calidad embrionaria pos descongelación también afecta los porcentajes de preñez, con valores que oscilan entre 30 y 68% para embriones de calidad regular y excelente, respectivamente (Munar y Hasler, 1989).

Cuando los embriones no van a ser transferidos en fresco sino almacenados, hay que tener en cuenta el método de criopreservación utilizado, es decir, cuando los embriones son congelados convencionalmente, las tasas de preñez oscilan entre 50 y 60% resultando levemente inferiores a las obtenidas con embriones frescos (Hill, 1996; Dochi *et al.*, 1998; Beal *et al.*, 1998; Cutini *et al.*, 1999;); cuando se utiliza la vitrificación como método de conservación, los porcentajes de preñez oscilan entre 0 y 60% (De Leeuw *et al.*, 1992; Rall, 1992; Tachikawa, *et al.*, 1993; Agca *et al.*, 1994). Las bajas temperaturas a las que son sometidos los embriones así como las altas concentraciones de crioprotectores utilizadas serían la causa de la disminución en la viabilidad de estos embriones (Dobrinsky, 1996; Overstrom, *et al.*, 1993; Pollard y Leibo, 1994).

4.7 Receptoras

Si la manipulación de los embriones y su evaluación morfológica han sido realizadas correctamente, se considera que todos los embriones seleccionados se

encuentran con posibilidades de establecer una preñez, por lo tanto a partir de allí todo dependerá de la receptora y de la transferencia (Broadbent *et al.*, 1991).

Las receptoras deben ser reproductivamente sanas para recibir un embrión y llevar la gestación a término, poseer un tamaño que les permita parir sin grandes dificultades y deben ser de buena capacidad lechera para alimentar al ternero de manera que le permita expresar su potencial genético (Alberio, 1993). La disponibilidad, el costo y la adaptación al medio, en términos de alimentación, enfermedades y cambios climáticos, son probablemente los factores más importantes que gobiernan la elección de la receptora (Broadbent *et al.*, 1991). La situación ideal es aquella donde las receptoras son del propio establecimiento dado que su historia reproductiva es conocida y al haber sido criadas en el lugar, el estrés sufrido será menor. Utilizando estas receptoras, se suele obtener un 10% a un 15% más de preñez que con el empleo de animales recientemente incorporados al rancho (Alberio, 1993).

Los trabajos de investigación de los últimos años han sido orientados principalmente a los embriones, tendiendo a mejorar su viabilidad después de la transferencia. En contraste, son menores los esfuerzos que se han hecho para incrementar el potencial de las receptoras para preñarse y llevar la gestación a término (Macmillan y Donnison, 1999).

Los aspectos más relevantes relacionados con las receptoras que pueden afectar el resultado final en un programa de transferencia embrionaria son: raza, categoría, estado nutricional, empleo reiterado, calidad del cuerpo lúteo y nivel de progesterona, sincronización con respecto a la donadora y al embrión.

4.7.1 Raza

Las evidencias en la literatura sobre el efecto de la raza de la receptora sobre el resultado de la transferencia son escasas. Generalmente se prefiere razas

cruzadas antes que a las puras, posiblemente porque las primeras sean más fértiles (Broadbent *et al.*, 1991). Según la opinión de estos autores, las cruizas entre las razas británicas y la Holstein son preferibles a las cruizas continentales porque ellas son baratas, de tamaño medio y de buen potencial lechero, además algunas cruizas continentales son consideradas temperamentales. Por otra parte, prefieren animales de origen lechero, particularmente si se trata de vaquillas o vacas jóvenes, antes que animales para carne con cría al pie. Argumentan su elección en que dichos animales son más dóciles y probablemente más fértiles. Además, generalmente ofrecen menos dificultades para llevar a cabo la transferencia. No obstante, otros autores, si bien transfirieron embriones congelados y vitrificados, no hallaron diferencias de preñez entre receptoras de razas lecheras (46,0%), de producción de carne (43,2%) y doble propósito (43,9%) (Van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 1997).

4.7.2 Edad

Este es un aspecto importante, pero con criterios encontrados respecto a si es mejor utilizar vaquillas o vacas. Los investigadores que proponen el uso de vacas lo hacen argumentando que las mismas ya han parido alguna vez. Por otro lado, las vaquillas son seleccionadas principalmente como receptoras por razones económicas, logísticas y técnicas, entre ellas podemos mencionar que es menos probable que se encuentren bajo estrés nutricional o que tengan una historia de problemas sanitarios, además el útero virgen es más apropiado para recibir un embrión transferido. Se considera que, así como en la inseminación artificial, en la transferencia embrionaria se obtiene mayor porcentaje de preñez en vaquillas que en vacas (Alberio, 1993). Sin embargo, muchos autores no hallaron diferencias (Wright, 1981; Munar y Nigro, 1985; Broadbent *et al.*, 1991; Callesen *et al.*, 1994; Schönmutz y Neumann, 1995).

El porcentaje de receptoras que abortan después de que ha sido confirmada la preñez oscila entre el 5% (Callesen, *et al.*, 1995; King *et al.*, 1985), resultando

similar al reportado en hembras inseminadas. Munar *et al.*, (1990), observaron mayor porcentaje de abortos cuando se utilizaron como receptoras vaquillas. Tales diferencias no fueron corroboradas por otros autores (Callesen *et al.*, 1994; Callesen *et al.*, 1996).

Wright (1981), observó que el estrés lactacional no tuvo efecto sobre la tasa de preñez, no encontrando diferencias entre las vacas con cría al pie y las vacas secas. Por otro lado, Van Wagtendonk-de Leeuw *et al.*, (1997), no hallaron diferencias de preñez entre receptoras que tenían de 1 a 7 pariciones. Si bien las vacas pueden, en general, tener un porcentaje de preñez ligeramente inferior a las vaquillas, cuando también se tienen en cuenta la supervivencia y la viabilidad de sus crías, la tasa de éxito final es de la misma magnitud que cuando se emplean novillas (Alberio, 1993; Callesen, 1996). Además el cérvix de las vaquillas es estrecho y durante la fase luteal se encuentra cerrado, lo cual dificulta en algunas ocasiones la inserción del instrumental de transferencia, requiriendo un tiempo adicional que actúa negativamente sobre el resultado final (Kanawaga, 1993).

En las condiciones de manejo semiintensivo o extensivo, Alberio (1993) recomienda la utilización de vacas jóvenes de primera y segunda parición, las que al tener menos problemas al parto permitirán obtener resultados superiores que con vaquillas. En síntesis, si bien existen razones biológicas, prácticas y técnicas que justifican la elección de vaquillas o vacas, tanto unas como otras pueden resultar muy buenas receptoras después de una adecuada selección. La elección de la categoría dependerá de las condiciones bajo las cuales se desarrolle el programa de transferencia (Callesen *et al.*, 1994).

4.7.3 Estado nutricional

La nutrición es un factor importante en el manejo de las receptoras y afecta todos los aspectos de la reproducción. Por lo tanto, las receptoras preñadas no deben ser tratadas como cualquier otra vaca, ya que gestarán y amamantarán a los

becerros de mayor valor del establecimiento, resultando vital la alimentación de las mismas para el éxito final de la transferencia (Alberio, 1993).

La condición corporal de las receptoras y el contenido energético de la alimentación que éstas reciben son los factores más importantes. El cambio que se produce en la condición corporal entre el parto y la transferencia, guarda estrecha relación con el contenido energético de la alimentación que la receptora recibe en dicho período. Si se produce una disminución marcada de la condición corporal se afectan el intervalo parto-celo y los porcentajes de preñez y parición. Tomando como referencia la escala 1-5, es necesario lograr una condición corporal 2,5 al parto para que ésta no resulte inferior a 2 en el momento de la transferencia. Luego, el nivel energético debe seguir siendo correcto, sin llegar al exceso, y debe continuar hasta que la implantación del embrión haya finalizado, resultando determinante entre los días 21 y 45 de gestación (Sreenan y Diskin, 1987; Pampillo, 1988).

Mapletoft *et al.*, (1986), obtuvieron mayor porcentaje de preñez con receptoras de condición corporal entre 2 y 3, que con aquellas de <1 o > 4.

4.7.4 Reutilización de receptoras

Cuando se establece un programa de transferencia embrionaria surge el interrogante sobre cuántas veces puede repetirse la transferencia a una misma receptora. Se ha observado que la tasa de preñez no es afectada hasta la tercera transferencia y que luego tiende a disminuir progresivamente (Donaldson, 1985; Hasler *et al.*, 1987; Callesen *et al.*, 1996). Esto ocurre con vaquillas y vacas (Callesen *et al.*, 1996) y con embriones producidos *in vivo* e *in vitro*. Con base en esta información se ha establecido un criterio donde se señala que cada receptora podrá tener tres oportunidades de quedar preñada, luego de haber sido transferida correctamente con un embrión de buena calidad (Alberio, 1993).

4.7.5 Tamaño del cuerpo lúteo y nivel de progesterona de la receptora

Considerar la calidad del cuerpo lúteo a partir de su tamaño y consistencia, como un factor asociado al éxito en la selección de las receptoras parece razonable; sin embargo, no es posible establecer una relación entre la calidad del cuerpo lúteo y la preñez (Looney *et al* 1984; Donaldson, 1985; Palma, 1993; Bó *et al*, 1999).

Actualmente, es aceptado que existen factores más importantes a tener en cuenta para descartar o seleccionar una receptora. Entre ellos, haber observado el celo y comprobado la presencia de un cuerpo lúteo funcional, cualquiera fuese su calidad (Hasler *et al.*, 1987; Callesen *et al.*, 1994). Probablemente, el empleo de la ecografía y el análisis computarizado de imágenes aportarán en un futuro próximo nuevas herramientas para mejorar la clasificación del cuerpo lúteo (Lagomarsino *et al.*, 1999).

La progesterona es indispensable para el establecimiento y el mantenimiento de la preñez. No obstante, fueron infructuosos los intentos de seleccionar a las receptoras en base al nivel de dicha hormona al momento de la transferencia dado que éste, no se correlacionó con el porcentaje de preñez (Sreenan y Diskin, 1987; Payas, 1989; Ellington *et al.*, 1991; Palma, 1993). Además, se ha observado en las receptoras que la repetibilidad de los niveles de progesterona en el día 7 del ciclo estral es baja (Reed *et al.*, 1985).

4.8 Relación día de la donadora – día de la receptora

La sincronía que se establece entre la donadora y la receptora condiciona el éxito de la transferencia, pues para la nutrición del embrión resulta necesario que el ambiente uterino de ambas sea similar (Kanawaga, 1993). Debido a la diversidad de criterios existente en la bibliografía, en cuanto al sincronismo entre la donadora y la receptora, se asume como asincronía positiva (+) a aquella en donde la receptora se presenta en celo antes que la donante. Por el contrario, se considera

una asincronía negativa (-) cuando la receptora presenta celo después que la donadora. Se ha llegado a tolerar hasta una asincronía de ± 48 hrs. (Lindner y Wright, 1983; Mapletoft *et al.*, 1988), y se ha observado que no se producen grandes diferencias de preñez con asincronías de hasta ± 36 hrs., no obstante, se considera que para la obtención de buenos resultados no se debe superar las ± 24 hrs. de asincronía (Mapletoft, 1989; Palma, 1993).

Cuando la donadora y las receptoras presentaron celo simultáneamente se obtienen mejores tasas de preñez (Donaldson, 1985), sin embargo, generalmente se considera que es más probable obtener mejores resultados transfiriendo a receptoras con asincronía positiva (Coleman *et al.*, 1987; De Armas *et al.*, 1986; Hasler *et al.*, 1987; Breuel *et al.*, 1991; Kanawaga, 1993). Si bien la causa es desconocida, es probable que los embriones de vacas con ovulación múltiple estén levemente más avanzados en el desarrollo que aquellos provenientes de un animal no superovulado, de ahí que tengan mayor posibilidad de implantarse en una receptora con un ciclo estral más avanzado.

La sincronía donadora -receptora no debe ser analizado como un factor que en forma aislada pueda afectar el porcentaje de preñez. Hasler *et al.*, (1987), transfirieron embriones de distintos grados de calidad a receptoras con sincronía y con asincronía (+) y (-), obtuvieron buenos porcentajes de preñez con embriones de calidad buena y receptoras con y sin sincronía. Por el contrario, cuando los embriones transferidos fueron de calidad pobre, los mayores porcentajes de preñez se obtuvieron en receptoras con asincronía negativa. Esto puede estar relacionado con el hecho que en los embriones de calidad pobre, el desarrollo embrionario retardado es frecuente, resultando un mejor ambiente uterino para este tipo de embrión, el proporcionado por una receptora con asincronía negativa.

4.9 Relación desarrollo del embrión – día de la receptora

Si tenemos en cuenta que en un animal superovulado los folículos pueden ovular en un periodo largo y que además el desarrollo del embrión se acelera, el sincronismo entre la donadora y la receptora puede no ser el mejor indicador a tener en cuenta en el momento de decidir qué embrión transferir en una determinada receptora. Es por ello que, en el momento de efectuar la transferencia, debe ser considerada también la sincronía embrión-receptora.

Por ejemplo, si la recolección se lleva a cabo en el día 7 y contamos con receptoras disponibles entre los días 6-8 del ciclo estral, las mórulas deben ser transferidas a las de día 6, las mórulas compactas y blastocistos tempranos a las de día 7 y los blastocistos expandidos a las de día 8 (Saito, 1994). Esta recomendación se basa en trabajos en los que se observó que la transferencias de embriones en estadios más avanzados (blastocistos expandidos y eclosionados) a receptoras con asincronía negativa, resultó en una disminución del porcentaje de preñez (Hasler, 1987; Breuel *et al.*, 1991). Cuando se transfieren embriones congelados, las receptoras deben estar en sincronía con el estadio de desarrollo del embrión al momento de la congelación (Mapletoft *et al.*, 1988). No obstante, según Wright (1981), la tasa de preñez depende de la capacidad de los distintos estados de desarrollo embrionario para implantarse y no de la sincronía donadora-receptora, cuando ésta no supera las ± 36 hrs. Por su parte, Donaldson (1985), observó que las mórulas tempranas toleran mejor la asincronía que cualquier otro estadio y que los embriones de calidad regular y mala, toleraron mejor la asincronía que los de calidad excelente o buena.

Cuando se emplean embriones producidos *in vitro* puede generarse confusión con respecto a la sincronía embrión-receptora dado que, en los sistemas de producción *in vitro*, se considera como día 0 al de la fecundación y en las receptoras el día 0 corresponde al estro. Hasler *et al.*, (1995), encontraron que la tasa de preñez no se vio afectada cuando se transfirieron embriones producidos in

vitro frescos en receptoras que se encontraban en el día 7 u 8 del ciclo estral y que presentaban una asincronía de ± 36 hrs.

4.10 Transferencia de los embriones

Los factores más importantes relacionados con la transferencia propiamente dicha que pueden influir en el resultado del programa son: ubicación del embrión en el útero, experiencia del operador, protección del aplicador de transferencia y la utilización de sedantes, relajantes uterinos y/o anestesia epidural.

4.10.1 Ubicación del embrión en útero y tiempo de transferencia

Estos factores son analizados en conjunto, dado que existe estrecha relación entre ambos. Rowe *et al.*, (1980), demostraron que el tiempo que invierte atravesar el cérvix y colocar el embrión en el cuerno uterino se correlaciona negativamente con el porcentaje de preñez. La velocidad con la que el operador realiza dicha maniobra depende principalmente del grado de dificultad que encuentra para atravesar el cérvix. En esas circunstancias, la experiencia resulta de vital importancia; observándose que cuando el pasaje a través del cérvix se realiza sin dificultad, los porcentajes de preñez son mayores (Boland *et al.*, 1976; Bowen *et al.*, 1978). Del mismo modo, operadores con experiencia pueden lograr buenos porcentajes de preñez (50%) aún cuando deben transferir los embriones a receptoras que presentan un cuello uterino tortuoso, difícil de pasar (Wright, 1981). Munar *et al.*, (1990), reportaron que el grado de dificultad al atravesar el cérvix con el aplicador y la dificultad para depositar el embrión en el sitio deseado del útero, afectaban significativamente la tasa de abortos.

En la mayoría de estos trabajos, realizados hace más de 20 años se observaron diferencias entre operadores pese a que los porcentajes de preñez que se registraban en ese momento eran relativamente bajos. Por entonces, el método no

quirúrgico estaba siendo puesto a punto y era común que, a causa de la maniobra, se produjera luteólisis y por consiguiente mortalidad embrionaria.

En diferentes trabajos quedó claramente demostrado que el embrión debe ser transferido al cuerno uterino ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo (Christie y Rowson, 1978). Teniendo en cuenta que la migración transuterina rara vez ocurre en bovinos (Sreenan, 1976.; Tervit *et al.*, 1977), dicha ubicación favorece el reconocimiento materno de gestación (Kanawaga, 1993). En cambio, no resulta tan claro el lugar preciso donde el embrión debe ser depositado dentro del cuerno uterino. En un principio, basado en la experiencia con la transferencia quirúrgica, se indicaba que el embrión debía ser colocado en el tercio anterior del cuerno uterino. Rowe *et al.*, (1980), no encontraron diferencias en el porcentaje de preñez entre los tercios anterior y medio, sin embargo, Sreenan y Diskin (1987) sostienen que el intento de transferir embriones por delante del tercio medio con un catéter rígido puede lesionar el endometrio y en consecuencia, causar mortalidad embrionaria, mientras que Callesen *et al.*, (1994), en un estudio que involucró más de 2000 transferencias, observaron mejores resultados transfiriendo en el tercio anterior, con respecto al medio y especialmente al posterior.

4.10.2 Alternativas de mejoramiento de fertilidad en transferencia de embriones

La transferencia del embrión se efectúa cuando la receptora se encuentra en fase lútea. Esto es cuando su útero es susceptible a las infecciones. Sobre este aspecto hay que prestar especial atención, evitando que las bacterias presentes en los genitales externos y la vagina puedan ingresar al útero.

Takahashi *et al.*, (1982), citado por Kanagawa (1993), observaron que la protección de la pistola de transferencia con una camisa sanitaria estéril durante su paso por la vagina, incrementa de manera significativa el porcentaje de preñez. Mapletoft *et al.*, (1986), en cambio no corroboraron tales diferencias.

Por otra parte, Broadbent *et al.*, 1991, sostienen que pese a que la utilización de sedantes y anestesia epidural no es imprescindible, resulta conveniente para que el animal esté tranquilo y el operador pueda trabajar con comodidad. El costo de administrar estas drogas es bajo con relación a los beneficios potenciales, especialmente cuando la transferencia es efectuada por operadores sin demasiada experiencia. Con respecto a los relajantes uterinos, la administración de 300 mg de clorhidrato de clembuterol, 15-180 minutos antes de la transferencia, no produjo mejoras en el porcentaje de preñez (Wenkoff, 1986; Almeida, 1989).

Las alternativas utilizadas para incrementar los porcentajes de preñez han sido muy variadas. Una de ellas es el empleo de vesículas trofoblásticas, las cuales se transfieren conjuntamente con el embrión, con la finalidad de contribuir al mantenimiento de la fase lútea en la receptora, y mejorar la intensidad y la calidad de las señales embrionarias. Heyman *et al.*, (1987) transfirieron un embrión congelado y dos vesículas trofoblásticas congeladas simultáneamente. A los 45 días de gestación, la tasa de preñez de estas receptoras (73%) fue mayor que la del grupo control (43%). Las diferencias entre ambos grupos dejaron de ser significativas al día 90, siendo de 57% y 40%, respectivamente. En el primer grupo, las pérdidas se produjeron principalmente entre los días 45 y 60 de gestación, en cambio en el grupo control ocurrieron entre los días 21 y 45. Por otra parte se ha intentado modificar el estado fisiológico del útero por medio de una terapia suplementaria con progesterona. Crhistie *et al.*, (1979), emplearon 100 mg de progesterona entre los días 13 y 35 del ciclo de receptoras que habían recibido un embrión en el día 7, sin encontrar efecto alguno sobre el porcentaje de preñez. También se ha empleado en receptoras luego de ser transferidas, gonadotropina coriónica humana (HCG) por su efecto luteotrópico. Se llevaron a cabo distintos estudios donde las dosis empleadas variaron entre 1000 y 5000 UI, administradas en un solo momento o en un período comprendido entre el día 7 (momento de la transferencia) y el día 35. En estos estudios no se lograron mejorar los porcentajes

de preñez (Greve. y Lehn-Jensen, 1982; Massey *et al.*, 1983; Looney *et al.*, 1984; Sreenan y Diskin, 1987; Palma, 1993;).

Con la misma finalidad se ha empleado la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o alguno de sus análogos. Ellington *et al.*, (1991), administraron 8 mg de buserelina al momento de la transferencia o entre los días 4 y 7 pos transferencia. Los porcentajes de preñez logrados 72% y 66%, respectivamente no difirieron del grupo control, 68%.

V.- OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la viabilidad de implementar un programa de transferencia de embriones con productores del estado de Tabasco.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el sistema de preparación de hembras seleccionadas como receptoras bajo condiciones de productores comerciales en el estado de Tabasco.
- Estimar el costo y la viabilidad de la producción de embriones.
- Estimar la factibilidad de implementar un programa de transferencia de embriones en un sistema de cooperativa ganadera.

5.3 HIPÓTESIS

La viabilidad de implementar un programa de transferencia de embriones por parte de productores comerciales depende de las condiciones fisiológicas del ganado las cuales influyen en el costo de producción de los embriones y el costo de producción por gestación en condiciones del estado de Tabasco.

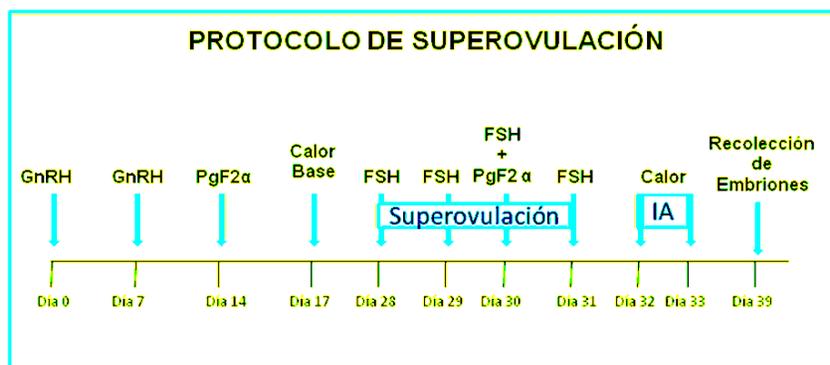
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Producción de embriones F1

La producción de embriones se llevó a cabo en el rancho “El Clarín” perteneciente al CEIEGT-FMVZ-UNAM localizado en Tlapacoyan Veracruz, esta ubicado en la parte centro del Estado de Veracruz a una altura de 151m.s.n.m. El clima de esta zona es cálido húmedo con una temperatura y precipitación media anual de 23.4°C y 1840 mm, respectivamente, en el cual se utilizaron como donadoras vacas de tipo *Bos indicus*. Otra fuente de embriones F1 se realizó en establos lecheros ubicados en la Cuenca Lechera de Tizayuca Hidalgo, la cual se localiza al Sur del Estado y se ubica entre los paralelos 19° 48' y 19° 55' de latitud Norte y 90° 00' y 99° 00' de longitud Oeste, a una altura de 2,270 metros sobre el nivel del mar, el clima que prevalece es templado frío, con una temperatura media anual de 14.9° C y una precipitación pluvial anual de 60 mm. La última fuente fue en el rancho particular “La Escondida” localizado en el estado de Aguascalientes situado entre las coordenadas 102°16' longitud oeste y 22°05' de latitud norte, con una altura de 1,880 metros sobre el nivel del mar y en el estado de Querétaro en el Rancho Loma Linda ubicado en el municipio de el Marqués, localizado entre las coordenadas 20°36' y 20°37' de Latitud Norte y a los 100°19' y 100°21' de Longitud Oeste, el clima predominante es el subtropical de altura, templado-semiseco. La temperatura media anual está comprendida entre los 18 y los 24°C, la precipitación pluvial registra de 400 a 500 milímetros cúbicos, siendo los vientos dominantes de Noreste a Suroeste. Las hembras utilizadas en estas dos últimas localidades fueron establos lecheros especializados utilizando vacas Holstein. (*Bos taurus*).

En total se utilizaron 26 vacas *Bos indicus* y 26 animales de tipo *Bos taurus*, los criterios para seleccionarlas como donadoras fueron que tuvieran un intervalo posparto de por lo menos 90 días (Wenkoff, 1983), menos de 5 partos, que no presentaran alteraciones o patologías en el tracto genital, que se encontraran ciclando y que presentaran una condición corporal de 2.5 a 3.5 en la escala de 1 al 5 (Mapletoft *et al.*, 1986).

Una vez seleccionadas las donadoras fueron sincronizadas mediante la administración de dos dosis de 100 µg de GnRH (Ovalyse, Pfizer México) vía intramuscular con un intervalo de 7 días entre cada dosis, 7 días después de la segunda aplicación de GnRH se administraron 25 mg de PGF2α (Lutalyse, Pfizer México) vía intramuscular, 24 horas después se comenzó con la detección continua de celos durante 72 horas. Diez días después de mostrar conducta de celo se realizó palpación rectal con la finalidad de detectar la presencia de un cuerpo lúteo, al día siguiente se inició el programa de superovulación, el cual consistió en la administración cada 12 horas (am-pm) de FSH-P1 (Folltropin -V® BIONICHE) a dosis decrecientes durante cuatro días. Al tercer día de superovulación (72 horas) se les administró 25 mg de PGF2α cada 12 horas (am-pm) vía intramuscular con la finalidad de lisar el cuerpo lúteo presente e inducir nuevamente el celo. Una vez detectado éste, se sirvieron mediante inseminación artificial a las 0,12 y 24 horas de iniciado el calor. La dosis total de FSH-P1 para vacas cebuinas y vaquillas Holstein fue de 280 mg y para vacas adultas Holstein de 400mg. Las donadoras *Bos taurus* fueron inseminadas con semen de tipo *Bos indicus* y las hembras *Bos indicus* con semen *Bos taurus* con la finalidad de que los embriones fueran de tipo F1. Al séptimo día después de la primera inseminación, se realizó una evaluación de los ovarios por palpación rectal para estimar el número de cuerpos lúteos y así determinar la respuesta superovulatoria. De acuerdo a este resultado, se llevó a cabo la recolección de los embriones vía transcervical en las vacas que se les encontró una respuesta mayor a dos cuerpos lúteos.



Esquema 1. Protocolo de ovulación múltiple para recolección de embriones.

Una vez recolectados los embriones fueron llevados al laboratorio para su búsqueda, evaluación y en su caso, la criopreservación. La búsqueda se realizó en cajas de petri cuadrículadas utilizando un microscopio estereoscópico (stereo zoom®6) a un aumento de 15x. Una vez encontrados, fueron colocados en un plato de petri con solución de mantenimiento (Holding) mediante una pipeta de 0.5 microlitros, para realizar la evaluación a un aumento de 60x. Los criterios utilizados para este fin fueron los citados en el manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS por sus siglas en inglés), en los cuales se establecen los estados de desarrollo y las calidades siguientes:

Estado de desarrollo:

- 1.- Infertilizado
- 2.- De 2 a 12 células
- 3.- Mórula temprana
- 4.- Mórula
- 5.- Blastocisto temprano
- 6.- Blastocisto
- 7.- Blastocisto expandido
- 8.- Blastocisto eclosionado
- 9.- Blastocisto eclosionado expandido

Grado o calidad:

CALIDAD 1: Excelente o bueno. Corresponde a aquellos embriones con una masa embrionaria simétrica y esférica con blastómeros uniformes en talla, color y densidad. Estos embriones coinciden con el estado de desarrollo esperado. Las irregularidades deben ser relativamente menores y al menos el 85% del material celular debe ser una masa embrionaria viable e intacta. La superficie de la zona pelúcida debe ser lisa y no cóncava.

CALIDAD 2: Regular. Moderadas irregularidades tanto en la forma de la masa embrionaria como en tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta y viable.

CALIDAD 3: Pobre o mala. Mayores irregularidades en la forma de la masa embrionaria, tamaño, color y densidad. Al menos 25% del material celular debe estar intacto y viable.

CALIDAD 4: Muerto o degenerado. Embriones degenerados, ovocitos o embriones de 1 célula: no viables.

Una vez evaluados, los embriones fueron colocados de manera individual en pajillas de 0.25 ml previamente identificadas de acuerdo a estado de desarrollo y calidad, para llevar a cabo el correcto cargado de la pajilla, ésta se lavó con el medio de mantenimiento en el que se encontraban los embriones, posteriormente se formaron franjas de medio y aire intercaladas, primero se introdujo medio-aire, medio-aire, posteriormente se introdujo el embrión con etilenglicol como crioprotector (Eldsen, 1986), y finalmente se procedió a introducir nuevamente unas franjas de aire-medio-aire. Una vez realizada esta acción, las pajillas fueron selladas con un aparato especial para cerrar totalmente la punta de éstas, después, las pajillas se introdujeron en el contenedor de una congeladora automática CONTROL FREEZE CL5500, previamente llenado con nitrógeno líquido y graduado a una temperatura de -6°C . Una vez depositados en el contenedor se indujo la formación de hielo (Seeding) procedimiento que consiste en tocar con un cotonete enfriado en nitrógeno una parte de la pajilla. Así permanecieron a esta temperatura durante 10 minutos, después, la temperatura comenzó a descender $0.5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta llegar a -32°C , una vez alcanzada esta temperatura las pajillas fueron depositadas en bastones mantenidos en nitrógeno líquido identificados con el registro del padre y madre del embrión y posteriormente fueron introducidas en termos contenedores a una temperatura de -196°C .

6.2 Criterios de selección de los productores

El trabajo de transferencia de embriones se llevó a cabo en 9 explotaciones comerciales de ganado de doble propósito, ubicadas en el municipio de Macuspana Tabasco, que se ubica al sur del estado, entre los paralelos 17°45' y 92°32' de latitud oeste. El clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano; tiene una temperatura media anual de 23.6°C, siendo la máxima media mensual en abril con 30.1°C y la mínima media en mayo con 29.8°C; la máxima y la mínima absoluta alcanzan los 30.1°C y 21.2°C, respectivamente. La precipitación pluvial es de 3,186 milímetros con un promedio máximo mensual de 350 mililitros en el mes de septiembre y una mínima mensual de 50 mililitros en el mes de abril. Dichas explotaciones fueron elegidas de un grupo de ganaderos, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a su ubicación, instalaciones para el manejo adecuado del ganado y el fácil acceso a éstas. A cada uno de los ranchos se realizaron visitas eventuales para establecer con los ganaderos que participaron en el estudio las expectativas del programa. Durante las visitas a las explotaciones, se conocieron las características de los ranchos, finalidad zootécnica, número de animales de acuerdo a su edad, sexo, etapa productiva y tipo de raza.

6.3 Selección y preparación de las receptoras

El criterio de selección de receptoras se basó principalmente en el intervalo posparto que debió ser de por lo menos 90 días (Wenkoff, 1983), que tuvieran menos de 5 partos, que no presentaran alteraciones o patologías en el tracto genital, que se encontraran ciclando y que presentaran una condición corporal de 2.5 a 3.5 en la escala de 1 al 5 (Mapletoft *et al.*, 1986).

Una vez seleccionadas, las posibles candidatas a receptoras fueron separadas del resto del hato con la finalidad de mantenerlas apartadas de los toros con el objetivo de tenerlas vacías para su posterior sincronización 20 días después. Una vez separadas, se les realizó un estudio ginecológico por medio de ultrasonido, para verificar que realmente se encontraran vacías; confirmado el diagnóstico, se

inició el programa de sincronización el cual se basó en la administración de 100 µg de Acetato de gonadorelina (Ovalyse, Pfizer México) vía intramuscular y la inserción de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR, Pfizer, Mexico), el cual permaneció *in situ* durante 7 días. Al retiro del dispositivo se les administró intramuscularmente 25mg de Dinoprost trometamina (Lutalyse, Pfizer, Mexico), 48 horas posterior a esto se administraron nuevamente 100 µg de Acetato de gonadorelina; siete días después, se realizó la transferencia embrionaria.

Durante este periodo se les proporcionó sal mineral en bloques a libre acceso y pastoreo continuo en potreros con pastos como estrella africana (*Cynodon plectostachyus*), alemán (*Echinochloa polystachya*) y pangola (*Digitaria decumbens*) además de encontrar en pequeñas proporciones jaragua (*Hyparrhenia ruffa*), gigante (*Leptochloa dubia*), zacatón (*Muhlenbergia sp*), grama remolino y egipto (*Brachiaria mutica*).



Esquema 2. Protocolo de sincronización de receptoras para transferencia de embriones.

6.4 Transferencia de los embriones

Para seleccionar a las vacas que se les transfirió un embrión, se sujetaron en una manga de manejo y se les realizó ultrasonido transrectal con un equipo ALOKA SSD 500 y un transductor de 7.5 Mhz, para la verificación de la presencia de un cuerpo lúteo y de esta manera poder continuar con el programa.

En las vacas que se encontró una estructura lútea con 7 días aproximadamente de formación en alguno de los ovarios, se procedió a la administración de 5 ml de lidocaína al 2% vía epidural a la altura de la última vértebra sacra y la primera vértebra coccígea, cinco minutos antes de la transferencia. Inmediatamente después, se lavó y secó la región perianal y labios vulvares, concluidos estos pasos, se colocó el embrión previamente descongelado durante 5 segundos al aire y 30 segundos en agua a una temperatura de 37°C, en un aplicador Cassou de ¼ cc. Con la ayuda de otra persona para abrir la vulva, se procedió a introducir el aplicador en una posición diagonal con la punta hacia arriba para que dentro de la vagina se dirigiera de manera horizontal hasta localizar la entrada del cuello del útero. Una vez ahí, se rompió la camisa sanitaria del aplicador y éste se introdujo a través del cérvix hasta el cuerpo del útero para después llegar al cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo y guiarlo suavemente hasta el tercio anterior del mismo donde se depositó el embrión evitando dañar el endometrio (Kraemer y Dorn, 1989).

6.5 Diagnostico de gestación

El diagnóstico de gestación se realizó 28 días (35 días de desarrollo embrionario) después de la transferencia, por medio de ultrasonografía con un equipo ALOKA SSD 500 y un transductor de 7.5 Mhz.

6.6 Análisis económico

Los cálculos para determinar los costos de producción por embrión se realizaron tomando en cuenta el valor de las hormonas para sincronizar y superovular, material para aplicación de las hormonas, para la recuperación de los embriones, material de laboratorio para búsqueda, evaluación y congelación de los embriones, alimentación de las donadoras, así como vacunas, desparasitantes, vitaminas y mano de obra, esto dio como resultado el costo por preparación de las donadoras.

Con base en estos puntos y de acuerdo a la cantidad de embriones recuperados por cada donadora, se estimó el costo de producción de cada embrión por raza.

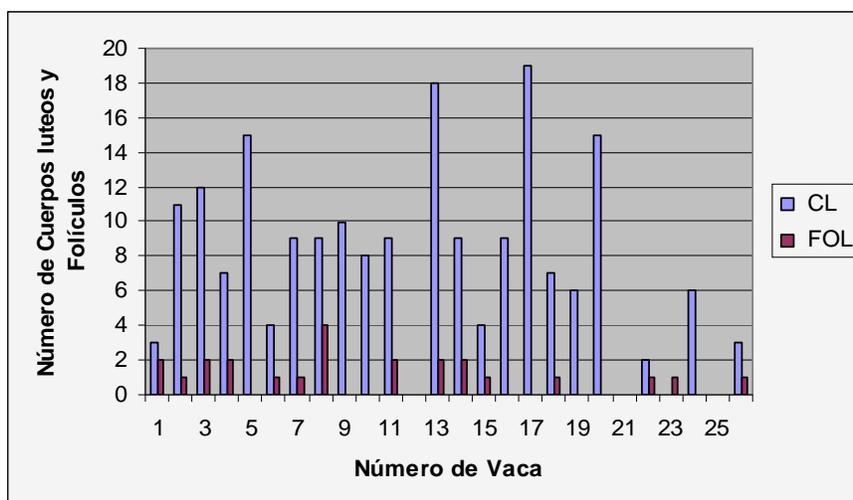
Para estimar el costo de preparación por receptora, se tomaron en cuenta los costos de las hormonas utilizadas para la sincronización, el material utilizado para la aplicación de las hormonas, el costo por concepto de alimentación durante el periodo de preparación. Una vez estimado este costo, se multiplicó por el número total de posibles receptoras. El costo por transferencia se calculó de acuerdo al material utilizado para la aplicación del embrión y la mano de obra. Una vez calculado este costo, se sumó al resultado obtenido por preparación de receptoras totales.

Para calcular el costo por gestación se sumaron el costo de producción por embrión, costo de preparación por receptora y costo de la transferencia. El resultado obtenido se multiplicó por el porcentaje de fertilidad obtenido de las transferencias embrionarias.

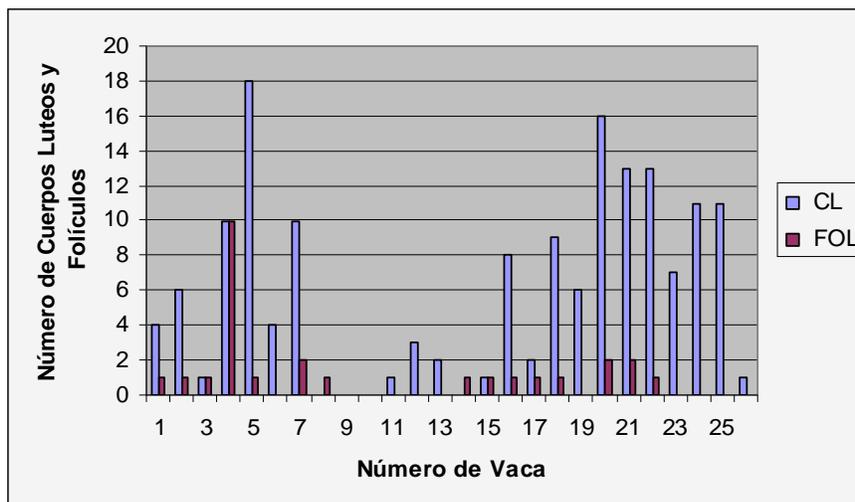
VII.- RESULTADOS

7.1 Respuesta a la ovulación múltiple

Para la producción de embriones F1 *Bos taurus* x *Bos indicus* se utilizaron 26 donadoras de la raza Holstein encontrándose un total de 195 cuerpos luteos (CL) y 24 folículos (Fol) por palpación rectal (Grafica 1). Asimismo para la producción de embriones F1 *Bos indicus* x *Bos taurus* se utilizaron 26 donadoras cebuinas encontrándose un total de 157 cuerpos luteos y 27 folículos. (Grafica 2).



Grafica 1. Respuesta a la ovulación múltiple en donadoras *Bos taurus*

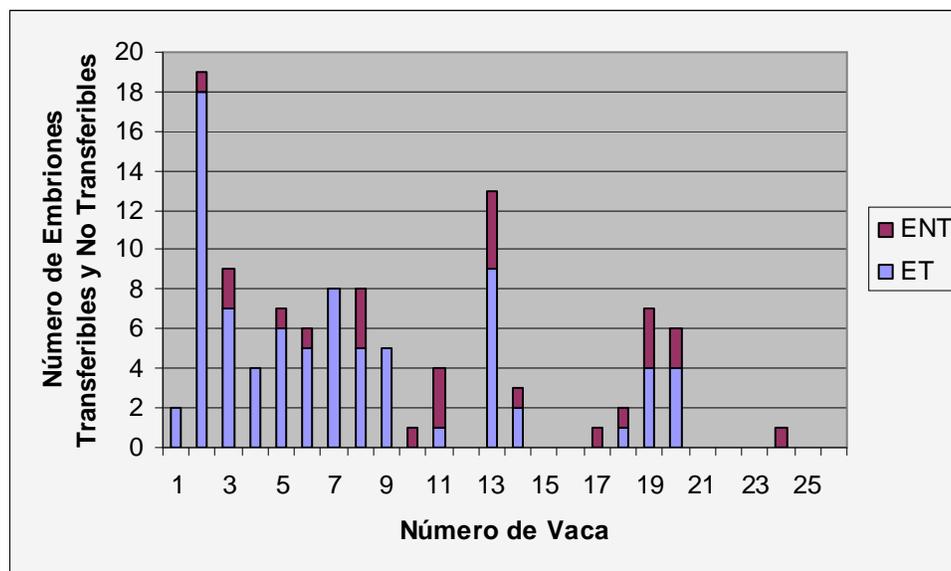


Grafica 2. Respuesta a la ovulación múltiple en donadoras *Bos indicus*

De acuerdo con estos datos se encontró que del biotipo *Bos taurus* el 15% de las hembras no respondieron a la FSH y de las *Bos indicus* el 26% dio resultados negativos al tratamiento.

7.2 Producción de embriones

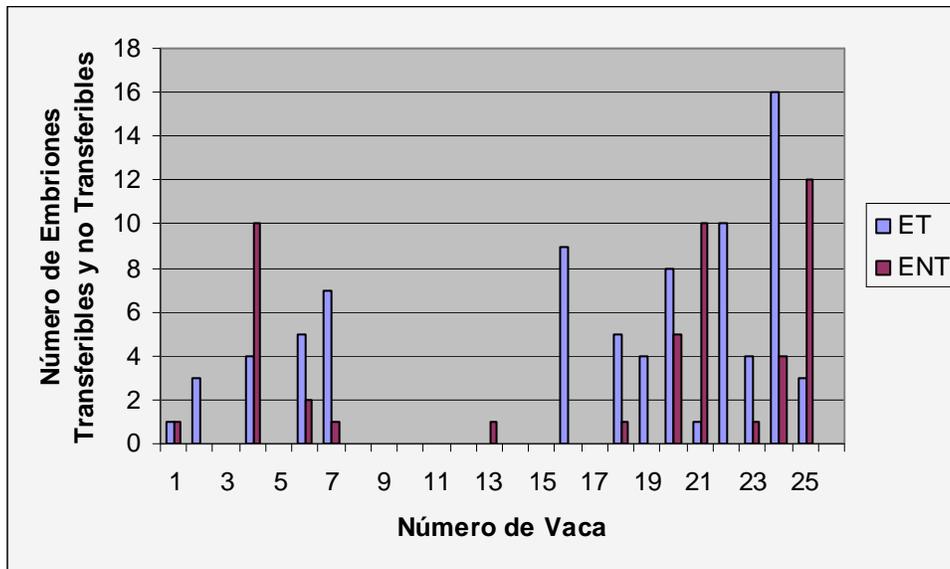
Por otra parte se encontró que el 18% de las donadoras *Bos taurus* que respondieron al tratamiento, no produjeron embriones. Del total de hembras en las cuales se colectaron embriones un 17% dieron embriones exclusivamente no transferibles, mientras que de un 22% de las vacas se colectaron únicamente embriones transferibles y el 61% produjeron embriones de ambos tipos. El promedio global de embriones transferibles por donadora fue de 3.1, mientras que el promedio calculado solamente en vacas en las que se colectaron embriones transferibles fue de 5.4. (Grafica 3).



Gráfica 3. Producción de embriones *Bos taurus*

Para la producción de embriones de hembras *Bos indicus* con respuesta superovulatoria se obtuvo que el 17% de las donadoras no produjeron embriones. Asimismo, el 27% de las donadoras que produjeron embriones dieron únicamente

embriones transferibles, el 7% produjo embriones no transferibles y el 67% produjeron embriones de ambos tipos, el promedio de embriones transferibles del total de animales que respondieron a la superovulación fue de 4.4 y el promedio obtenido del total de animales que produjeron embriones transferibles fue de 5.7 (Grafica 4).



Grafica 4 Producción de embriones *Bos indicus*

7.3 Costos de preparación por donadora

Cuadro 1.- Costos de preparación por donadora

Material para Sincronización y superovulación	Costo Unitario por vaca experimental
GnRH	\$60,00
PgF2α	\$68,00
Agujas 18 x 1 ½"	\$21,00
Jeringas 5ml	\$12,00
Jeringas 10ml	\$16,00
FSH-p	\$1.050,00
Detector de calores "estrous alert"	\$19,20
Semen	\$300,00
Sub total	\$1.546,20
Material/lavado	
Manguera Tygon	\$92,17
Filtro miniflush	\$253,91
Sonda Foley	\$53,91
Sol. Dullbeco	\$252,49
jeringas 10ml s/embolo	\$19,16
jeringas 20ml s/embolo	\$17,38
Medio de mantenimiento p/embriones	\$350,00
Etilenglicol	\$234,80
Pajillas	\$16,52
Albúmina	\$135,65
cajas Petri	\$165,21
Puntas ivf	\$71,30
Xilocaina 2%	\$14,93
Sub total	\$1.677,43
Mano de obra	\$2.000,00
Sanidad	\$70,00
Alimentación	Bos taurus \$1,050.00
	Bos indicus \$ 605.00
TOTAL	Bos taurus \$6,343.63
	Bos indicus \$5898.63

El costo de preparación y recolección de embriones por donadora es de \$6,343.63 y \$5898.63 para *Bos taurus* y *Bos indicus* respectivamente

7.4 Costo de producción por embrión

7.4.1 Donadoras *Bos taurus*

Se obtuvieron un total de 81 embriones transferibles F1 *Bos taurus* x *Bos indicus*, de un total de 26 donadoras, por lo que el costo de producción por embrión es de \$2,036.22.

7.4.2 Donadoras *Bos indicus*

Se trabajaron 26 donadoras del biotipo *Bos indicus* de las cuales se obtuvieron un total de 80 embriones, el costo de producción por embrión fue de \$1,917.05.

7.5 Edad de la donadora

Se trabajaron 10 vaquillas y 16 vacas en producción del biotipo *Bos taurus*, de las cuales se obtuvieron un total de 60 y 21 embriones transferibles respectivamente es decir un promedio de 6 embriones para las primeras y 1.3 embriones para vacas en producción, respecto a la cantidad de embriones no transferibles se obtuvieron un total de 9 y 16 embriones en vaquillas y vacas respectivamente.

Respecto a las donadoras de tipo *Bos indicus* no se llevo a cabo recolección de embriones en vaquillas debido a lo estrecho del cuello uterino en esta etapa.

7.6 Época del año

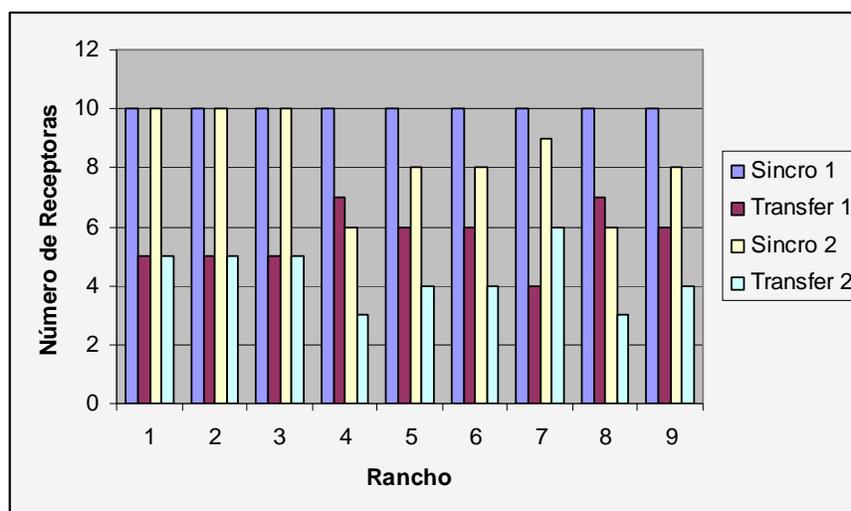
Se llevaron a cabo dos recolecciones de embriones en ganado de tipo *Bos taurus* (primavera e invierno) sin embargo no es posible hacer una comparación en este aspecto ya que no se contaron con vaquillas y vacas en las dos épocas del año.

Respecto al ganado *Bos indicus* se llevaron a cabo trabajos de superovulación en primavera y otoño el número de animales utilizados en cada época fue de 19 y 7 animales respectivamente, el total de embriones recolectados fue de 48 y 32 embriones transferibles para primavera y el otoño, con un promedio de 2.5 y 4.6 por época.

7.7 Sincronización de Receptoras

Se sincronizaron 165 posibles receptoras divididas en 2 programas de sincronización distribuidas en 9 ranchos, de las cuales fueron seleccionadas 10 de cada rancho para transferirles un embrión F1.

El programa de sincronización de las receptoras fue dividida en dos períodos por las distancias entre las fincas. Se encontró una respuesta al protocolo de sincronización del 57% en el primer programa, es decir, de 90 receptoras preparadas respondieron 51. De las 39 hembras que no respondieron y asumiendo una respuesta similar (\pm un 50%), se prepararon para el segundo programa un número adicional de 36 animales. En el segundo programa se sincronizaron 75 receptoras utilizando 39 hembras para un 53% de eficiencia en el programa de sincronización (Grafica 5).



Grafica 5.- Receptoras sincronizadas y seleccionadas

7.8 Costos de preparación por receptoras

Cuadro 2.- Costos de preparación por receptoras

Material para sincronización	COSTO UNITARIO
GnRH	\$60.00
PgF2α	\$68.00
Agujas 18 x 1 ½"	\$21.00
Jeringas 5ml	\$12.00
jeringas 10ml	\$16.00
Detector de calores "estrous alert"	\$19.20
Sub total	\$196.20
Alimentación	
Sal mineral	\$45.00
Alimento concentrado	\$360.00
Pastoreo	\$240.00
Sub total	\$645.00
Sanidad	\$70.00
TOTAL	\$911.20

De acuerdo con los resultados obtenidos del costo de preparación de las receptoras se estimó en \$911.20 hasta antes de la transferencia embrionaria.

7.9 Costos por Transferencia Embrionaria

Cuadro3.- Costos por Transferencia embrionaria

Material	Costo
Mano de obra	\$150.00
Fundas para transferencia de embriones	\$50.00
Xilocaina al 2%	\$16.50
Camisas sanitarias para la pistola para transferencia de embriones	\$3.50
TOTAL	\$220.00

De acuerdo con el número de animales adicionales el costo total es de \$68,325.00; y de acuerdo al costo obtenido por preparación y transferencia de las receptoras es de \$101,666.70. Si sumamos estos dos resultados el costo total para transferir 90 embriones es de \$169,991.70.

Si el costo promedio de cada embrión fue de \$1,976.63, el costo total de los embriones transferidos fue de \$177,897.15. Si a estos costos le agregamos el costo de preparación de las receptoras que fue de \$169,991.70, el costo total del programa fue de \$347,888.85.

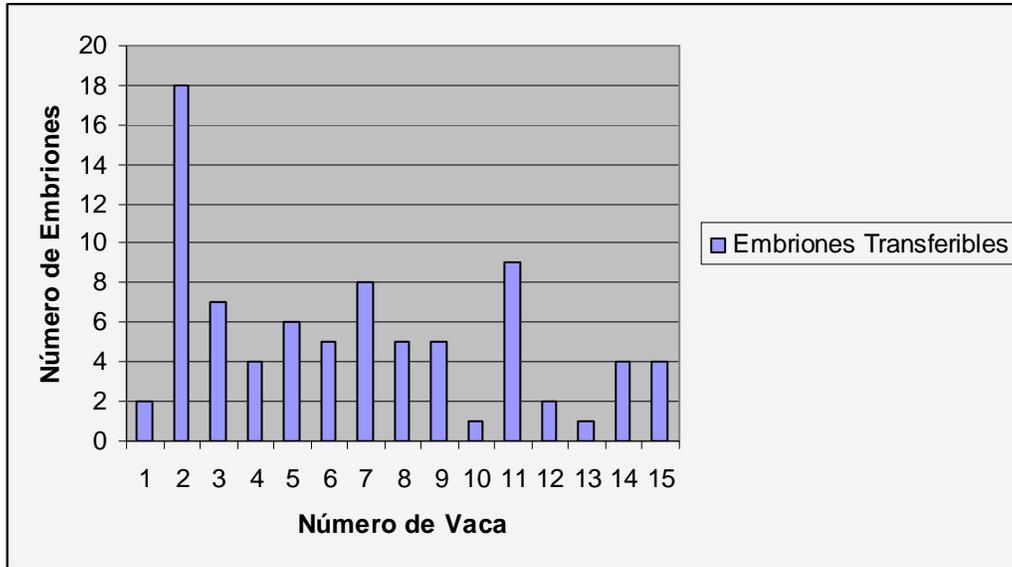
7.10 Costos por gestación

Tomando en cuenta que el porcentaje de fertilidad fue del 27% (24 gestaciones de 90 posibles), el costo total de cada gestación por transferencia de embriones es \$14,495.36 por gestación.

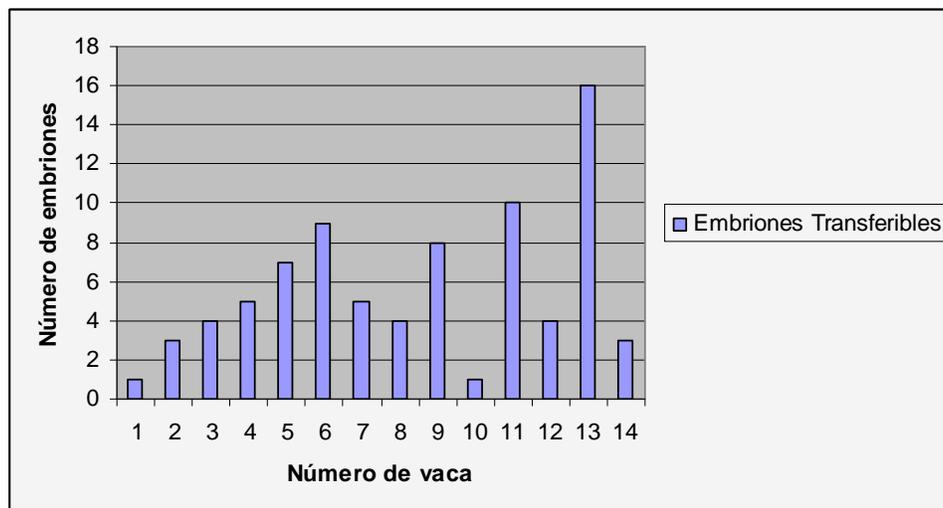
7.11 Estimación de resultados

7.11.1 Costos por embrión

De acuerdo a los protocolos de superovulación y tomando como base el eliminar a las donadoras que no produjeron embriones transferibles en el tratamiento de superovulación el promedio de embriones por vaca es de 5.4 para *Bos taurus* y 5.7 para *Bos indicus* los cuales son el resultado de 15 donadoras *Bos taurus* (Gráfica 6) y 14 donadoras *Bos indicus* (Gráfica 7). Por lo tanto, el 44% de las vacas no respondieron lo cual agrega una tara al costo de producción de los embriones. Si solamente tuviéramos hembras que respondieran al tratamiento superovulatorio el costo de producción de un embrión *Bos taurus* sería de \$1,174.74 y para *Bos indicus* de \$1,032.26 y con esto se reduciría la inversión en un 44% por este rubro.



Gráfica 6.- Respuesta embrionaria en vacas *Bos taurus*.



Gráfica 7.- Respuesta embrionaria en vacas *Bos indicus*

7.11.2 Costos por Transferencia

De acuerdo con las receptoras si se aumentara el porcentaje de respuesta al protocolo de sincronización a un 70%, necesitaríamos sincronizar 129 receptoras para poder transferir 90 embriones, con un costo por receptora de \$911.20. Por lo tanto, el costo total de este rubro sería de \$117,544.80. Si a este costo se le agregará la inversión para transferirles a 90 hembras un embrión (\$19,800.00), el

costo por transferir el total de los embriones es de \$137,344.80; por último la inversión para producir 90 embriones es de \$99,315.00, por lo que el costo total del programa sería de \$236,659.80, es decir, los costos se reducirían en un 32%.

7.11.3 Costos por gestación

Tomando en cuenta los costos totales del programa, si el porcentaje de gestación aumentara a un 50% es decir, 45 hembras gestantes de 90 posibles el costo por gestación sería de \$5259.10. Si redujéramos la incorporación al programa de animales que no responden y mejoráramos la fertilidad en la transferencia los costos se reducirían hasta en un 64%.

VIII.- DISCUSIÓN

De acuerdo a la respuesta a la ovulación múltiple obtenida en el presente trabajo los resultados indican que existe una alta variabilidad de las donadoras en la respuesta a la FSH, encontrando que en ganado *Bos indicus* el 27% producen aproximadamente el 50% de los embriones viables a la congelación y el 67% produjeron embriones viables y no viables, confirmando esto a lo encontrado por Mapletof *et al.*, (2002) quienes demuestran que existe una alta variabilidad en la ovulación múltiple, mencionando que el 24% de los animales hiperovulados producen embriones no viables, el 64% de las donadoras producen un promedio bajo de embriones transferibles y el 30% produce el 70% de los embriones. Dentro del ganado *Bos taurus* en el presente trabajo encontramos que el 22% de las donadoras produjeron el 23% de embriones viables para congelar y el 61% producen ambos tipos de embriones. Estos resultados son muy similares a los encontrados por Lerner *et al.*, (1986), utilizando vacas productoras de leche. Lo anterior demuestra que sin importar el biotipo utilizado para producir embriones, aproximadamente entre el 20 y 30% de las donadoras no producirán embriones de ningún tipo. (Baruselli *et al.*, 2006).

Una explicación a esta variabilidad podría ser la raza de la donadora ya que esta afecta directamente la transferencia embrionaria, incidiendo en el desarrollo y número de embriones con viabilidad para ser transferidos (Callesen *et al.*, 1995; Asada *et al.*, 2004). Una posible explicación en esta variabilidad podría ser las diferencias en la dinámica folicular entre razas (Barati *et al.*, 2006; Bó, 2003). Estos autores han demostrado que las hembras de tipo *Bos indicus* son mas susceptibles a las gonadotropinas que las *Bos taurus* por lo que en cada oleada folicular hay un mayor reclutamiento de folículos en las primeras (Baruselli, 2006), sin embargo, si la administración de FSH exógena es elevada, esto provocaría una respuesta exagerada, lo que provocaría un incremento en el número de embriones de mala calidad. (Greve *et al.*, 1995). Dosis elevadas de gonadotropinas producen una sobre estimulación ovárica donde muchos folículos

comienzan a desarrollar pero pocos son capaces de ovular y la mayoría sufre luteinización o atresia.

Además se ha observado que al aumentar la edad de la donante, disminuye el número de ovulaciones, la tasa de fecundación y la calidad embrionaria. La disminución en el número de ovulaciones se debería a una menor disponibilidad de folículos capaces de responder a gonadotropinas exógenas. Al existir menos folículos en crecimiento, los niveles de inhibina bajan y aumenta la FSH endógena; esto traería como consecuencia que en cualquier momento del ciclo estral los folículos en crecimiento estuvieran en un estado de desarrollo más avanzado que las estructuras correspondientes en los animales más jóvenes. Al comenzar el tratamiento con gonadotropinas, los folículos más maduros serían los primeros en producir grandes cantidades de estrógenos por mayor tiempo antes de la ovulación; comparándolos con los ovocitos dentro de los folículos menos desarrollados. Esta exposición a una alta concentración de estradiol podría ser la causa de la disminución en la tasa de fertilización y en la calidad embrionaria (Lerner *et al.*, 1986).

Sin embargo, aunque los resultados del presente trabajo en la respuesta a la ovulación múltiple sean similares en referencia a los embriones colectados en las hembras de tipo *Bos indicus*, la respuesta en relación al número de embriones colectados difiere, Looney *et al.*, (1986) encontraron en colecciones realizadas en ganado de carne 11.5 estructuras embrionarias en promedio con 6.2 embriones transferibles y en el presente estudio en donadoras *Bos indicus* se obtuvieron 4.9 estructuras en promedio de las cuales 3.1 fueron embriones de calidad 1 y 2.. Con respecto a los embriones producidos en vacas de tipo *Bos taurus*, Lerner *et al* (1986), encontraron en colecciones de donadoras productoras de leche resultados iguales a los de Looney *et al.*, (1986). Sin embargo, Barrios *et al.*, (1982) obtuvieron de doce vacas lecheras colectadas únicamente 13 embriones de buena calidad, contrastando con los resultados obtenidos en el presente trabajo en el cual se obtuvieron 81 embriones de la misma calidad utilizando 26 donadoras productoras de leche.

Diversos investigadores han encontrado que cuando la edad de la donadora aumenta, el número de ovulaciones es menor, al igual que el porcentaje de fertilidad y calidad embrionaria, (Lerner *et al.*, 1986; Hasler *et al.*, 1983). Estos reportes concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo ya que al realizar colecciones en vaquillas y vacas adultas productoras de leche se recuperaron en promedio 6 embriones para las primeras y 1.3 embriones para vacas en producción. Respecto a la cantidad de embriones no transferibles, se obtuvieron un total de 9 y 16 embriones en vaquillas y vacas respectivamente.

López *et al.*, (1995) al realizar una evaluación entre vacas y vaquillas en el trópico, no encontraron diferencias en el número de embriones recuperados, pero si en el porcentaje de embriones transferibles, en los cuales existía una notable superioridad en los embriones provenientes de vaquillas. En este trabajo no se pudo realizar este estudio en *Bos indicus* ya que en vaquillas es muy difícil realizar la técnica debido a que el cérvix es estrecho y no se puede llevar a cabo la recolección de los embriones. Todo esto tiende a indicar, que independientemente de la variabilidad que existe en la respuesta a la administración de FSH exógena, una opción para la producción de los embriones es la utilización de animales jóvenes ya que la respuesta es mayor.

Otro factor que afecta la calidad embrionaria es la época del año. Bastidas y Randel (1987), encontraron que al realizar colecciones embrionarias en dos épocas del año, este factor afecta significativamente la respuesta embrionaria, con un promedio de embriones viables de 4.2 y 2.9 en otoño e invierno respectivamente, siendo estos resultados muy similares a los encontrados en el presente trabajo en ganado de tipo *Bos indicus* donde se encontró que en colecciones efectuadas en primavera y otoño el promedio de embriones transferibles para primavera y el otoño fue de 2.5 y 4.6 respectivamente. Estos resultados nos indican que para obtener una mejor respuesta a la superovulación y con esto aumentar la producción en el número de embriones recuperados y de mejor calidad, lo ideal es llevar a cabo estos trabajos en animales jóvenes en la época de otoño.

Con respecto a la respuesta que se obtuvo en la sincronización de las receptoras, Montiel *et al.*, (2006) encontraron que de 215 receptoras preparadas únicamente se utilizaron 149, es decir un 69.3% de hembras en celo en respuesta a la sincronización comparado con 51% en el presente trabajo. Estas diferencias entre ambos estudios se pueden deber a que en el primer estudio la transferencia de embriones se realizó a celo detectado y en el segundo a tiempo fijo. Sin embargo, aunque la respuesta a la sincronización fue mejor en referencia a la detección de hembras en estro, la selección de receptoras aptas para ser transferidas fue un 10% mayor utilizando un protocolo de transferencia de embriones a tiempo fijo (45% vs.54.5%).

El porcentaje de gestación que se encontró en el presente estudio fue del 27% el cual concuerda con diversos estudios, los cuales demuestran que las gestaciones se encuentran entre el 25% y el 40% en embriones congelados (Niemann, 1991; Montiel *et al.*, 2006); aumentando un 10% con embriones en fresco (Cutini *et al.*, 2000; López *et al.*, 1995; Hasler, 1987). Se han encontrado porcentajes superiores a estos resultados en ganado de tipo *Bos taurus* los cuales se pueden deber a las condiciones ambientales, nutricionales y de manejo en las que se encuentra el ganado ya que la tasa de fertilidad puede llegar a alcanzar más del 60% (Spell *et al.*, 2001; Hasler, 1992).

Los costos de producción por embrión fueron mejores en donadoras de tipo *Bos indicus*, ya que el rubro de alimentación es menor y la producción de embriones viables es mayor. Aunque la variabilidad en la respuesta es menor en *Bos taurus*, la aplicación de un programa de transferencia de embriones se ve limitado debido a la falta de animales que puedan servir como donadoras para proveer de embriones de alto valor genético a pequeños productores del trópico. La gran variabilidad encontrada en la respuesta superovulatoria de las donadoras origina problemas que afectan la eficiencia y rentabilidad de un programa de transferencia de embriones (Hasler *et al.*, 1983). Otro factor que influye en los altos costos de un programa es la falta de animales que puedan responder a un tratamiento de sincronización para poderles transferir un embrión. (Bó *et al.*, 2002).

Si realizáramos una simulación suponiendo que las hijas de las vacas aumentarán en su producción de 4 a 8 litros por ser del tipo F1 las cuales se adaptan mejor al trópico (Cunningham, 1989) y manteniendo un porcentaje de concepción del 30% los costos se reducirían de la siguiente manera: El costo por gestación en el presente estudio es de \$14,495.36 suponiendo que 50% son hembras y 50% son machos la gestación para que nos produzca un reemplazo costaría \$28,990.72. Asumiendo que el 30% de los reemplazos no llegan a parir por diversas razones (Galina y Arthur, 1989) el costo sería de \$37,687.93. La lactancia en una vaca comercial a 305 días es de aproximadamente 1220 Litros. El costo por litro es de \$5.00 luego entonces la ganancia total evaluada por el número de litros producido es de \$6,100.00. Por lo tanto se necesitarían 6.2 vacas comerciales para cubrir el costo de una vaca F1 producida por transferencia de embriones de acuerdo a los datos obtenidos en el presente estudio.

Por otra parte, si hiciéramos una comparación entre la inseminación artificial y la transferencia de embriones, nos damos cuenta que los porcentajes de gestación por inseminación artificial oscilan entre el 30 y 60% (Geary *et al.*, 2001; Peeler *et al.*, 2004) porcentajes similares a los encontrados por transferencia de embriones los cuales oscilan entre un 40 y 70% (Farin y Farin, 1995; Hasler *et al.*, 1995; Merton, 1997; Aller *et al.*, 2000). Sin embargo, los costos de producción de cada una de estas biotecnologías si son significativamente diferentes ya que en la actualidad el precio de un embrión se encuentra tabulado entre \$200 y \$300 USD y una pajilla de semen de sementales elite aproximadamente oscila entre \$50 y \$100 USD; aunque con la inseminación artificial tendrían que pasar varios años para obtener resultados en cuestión de progreso genético del hato (Seidel, 1981), al contrario de la transferencia de embriones en la que se obtienen resultados en un intervalo de tiempo relativamente corto (Christensen, 1991), por lo que ésta sería la mejor opción después de la inseminación artificial (Lohuis, 1995), teniendo esta como principal uso ampliar los porcentajes reproductivos de animales con alto valor, ya que en el ganado los porcentajes reproductivos son bajos y el intervalo generacional es largo (Seidel, 1991).

IX.- LITERATURA CITADA:

1. Agca Y, Monson RL, Northey DL, Abas Mazni O and JJ Rutledge (1994) Post-thaw survival and pregnancy rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification *Theriogenology* 41, 154.
2. Agca Y, Monson RL, Northey DL, Abas Mazni O, Schaefer DM and JJ Rutledge (1998) Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos, normal calving, birth weight and gestation lengths *Theriogenology* 50, 147-162.
3. Alberio R, Mezzadra C, Homse A, Sampedro D. 1993. Pubertal traits and seasonal variation of the sexual activity in Brahman, Hereford and crossbred heifers. *Theriogenology*. 40(5):987-96.
4. Aller JF, Alberio RH, Iovannitti B y J Cabodevila (1995) Criopreservación de embriones mamíferos 1ra Parte Características generales de la congelación *Revista de Medicina Veterinaria* 76,132-136.
5. Aller JF, Alberio RH, Palma GA. Gestación con embriones producidos in vitro a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. 2000. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 32:33-39.
6. Almeida, A.P. 1989. Nonsurgical embryo transfer in cattle: The effect of clenbuterol on pregnancy rates. *Theriogenology*, 31:166.
7. Armstrong D.T., Recent advances in superovulation of cattle, *Theriogenology* 39 (1993) 7–24.
8. Arreseigor CJ, Sisul A, Arreseigor AE and RC Stahringer (1998) Effect of cryoprotectant, thawing method, embryo grade and breed on pregnancy rates of cryopreserved bovine embryos *Theriogenology* 49, 160.
9. Niasari-Naslaji A, Bolourchi M, Sarhaddi F, Razavi K, Naghzali E, and Thatcher WW. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogenology*. 2006 Sep 15;66(5):1149-55.
10. Baruselli PS, de Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bó GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2006 Jan 7;65(1):77-88
11. Bautista JN and H Kanagawa (1998) Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals, Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice *Jpn J Vet Res* 45, 183-191.

12. Beal WE, Hinshaw RH and SS Whitman (1998) Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer *Theriogenology* 49, 241
13. Betteridge KJ. An historical look at embryo transfer. *J Reprod Fert* 1981, 62: 1-13.
14. Bezugly N, Ostashko F and V Pesotsky (1988) Cold shock of mouse and cattle embryos In, *Proceedings 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination* Dublin, Ireland, pp 142.
15. Bó, G.A., Cutaia, L., Tríbulo, R., Moreno, D., Caccia, M. y Tríbulo, H. 1999. Efecto de la calidad del cuerpo lúteo a la palpación rectal sobre el porcentaje de preñez de embriones frescos y congelados. *III Simposio Internacional de Reproducción Animal*, pg. 207.
16. Bó GA, Baruselli PS and Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 2003 Oct 15;78(3-4):307-26.
17. Bó G, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology.* 2006; 65: 89-101.
18. Bó G.A., Moreno D., Cutaia L., Baruselli P.S. & Reis E.L. 2004. Hormonal manipulation of the estrous cycle in bovine embryo donors and recipients. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32 (Suppl): 1-22.
19. Borland R, Biggers J and C Lechene (1976) Kinetic aspects of rabbit blastocoele fluid accumulation, An application of electron probe microanalysis *Dev Biol* 50,201-211.
20. Boland, M.P., Crosby, T.F. and Gordon, I. 1976. Birth of twin calves following a single transcervical non-surgical egg transfer technique. *Vet. Rec.*, 99: 274-275.
21. Bowen, J.M., Elsdén, R.P. and Sidel, G.E., Jr. 1978. Non surgical embryo transfer in cow. *Theriogenology*, 10: 89-96.
22. Bouyssou, B and D Chupin (1982) Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxyde (DMSO) or glycerol *Theriogenology* 17, 159-166.
23. Bredbacka P. Recent developments in embryo sexing and its field application. *Reprod Nutr Dev.* 1998 Nov-Dec;38(6):605-13.
24. Brem, G. 1986. Micromanipulación en embriones bovinos y su aplicación en mejoramiento animal. *Hemisferio Sur, Argentina*, 1-209.

25. Breuel, K.F., Baker, R.D., Butcher, R.L., Townsend, E.C., Inskip, E.K., Dailey, R.A. and Lerner, S.P. 1991. Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*, 36:241-255.
26. Broadbent, P.J., Stewart, M. and Dolman, D.F. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology*, 35:125-139.
27. Bui-Xuan-Nguyen N, Heyman Y and J Renard (1984) Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature *Theriogenology* 22, 338-339
28. Bungartz L, Niemann H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil.* 1994; 101(3):583-91
29. Butler JE and Biggers JD. Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology.* 1989, 31; 1: 115-126.
30. Butler JE and Biggers JD. Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology.* 1989, 31; 1: 115-126.
31. Callesen, H., Bax, A. and Greve, T. 1994. Embryo recipients: Dairy cows or heifers? Proc. of the 10th Scientific Meeting of the Association Eur. Transf Emb., September 1994, Lyon, France. Fondation Merieux, Lyon, pp. 125-135.
32. Callesen, H., Lovendahl, P., Bak, A. and Greve, T. 1995. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J. Anim. Sci.*, 73:1539-1543.
33. Callesen, H., Liboriussen, T. and Greve, T. 1996. Practical aspects of multiple ovulation embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 42:215-226.
34. Chesne, P., Heyman, Y., Chupin, D., Procureur, R. and Menezo, Y. 1987. Freezing cattle demi-embryos: influence of period of culture between splitting and freezing on survival. *Theriogenology*, 27:218.
35. Christie, W.B., Newcomb, R. and Rowson, L.E.A. 1979. Embryo survival in heifers after transfer of an egg to the uterine horn contralateral to the corpus luteum and the effect of treatment with progesterone or hcg on pregnancy rates. *J. Reprod. Fert.* 56:701-706.
36. Christensen LG. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology.* 1991, 35; 1: 141-149.

37. Chupin D and R Procureur (1984) Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts, Effect of number of steps and of total duration Theriogenology 21,230
38. Chupin D, Florin B and R Procureur (1984) Comparison of two methods for one step in-straw thawing and direct transfer of cattle blastocysts Theriogenology 21, 455-459
39. Cunningham EP. The genetic component of cattle in developing countries. Theriogenology, 31: 17-24 (1989).
40. Cutini A., Teruel M and Cabodevila J. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. Taurus. 2000, 7:28-39.
41. Cutini, A., Teruel, M. y Cabodevila, J. 1999. Criopreservación de embriones de especies de interés pecuario. Rev. Arg. Prod. Anim., 19:447-469.
42. De Armas, R., Solano, R. y Caral, J. 1986. Transferencia no quirúrgica de embriones en el bovino por un método transcervical. Revista Cubana de Producción Animal, 12:103-112.
43. Van Wagtendonk-de Leeuw AM, den Daas JH, Kruip TA and WF Rall (1992) The relative efficacy of bovine embryo cryopreservation by vitrification and conventional slow freezing In, Proceedings 12th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination The Hague, The Netherlands, pp 1505-1507
44. Dobrinsky JR (1996) Cellular approach to cryopreservation of embryos Theriogenology 45, 17-26
45. Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T and S Inohane (1998) Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program Theriogenology 49, 1051-1058.
46. Donaldson LE. Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle. Vet. Rec., 1986. 18:661-663.
47. Donaldson LE. LH and FSH profiles at superovulation and embryo production in the cow. Theriogenology. 1985 Mar;23(3):441-7
48. Elsdon RP, Warfield SJ, Seidel GE Jr, Transfer of bovine demi-embryos with and without the zona pellucida. Anim Sci. 1987; 65(3):756-61.

49. Ellington E, Foote RH, Farrell PB, Hasler JF, Webb J, et al. Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology* 36 (1991), pp. 1035–1042.
50. Farin PW and Farin CE. Transfer of bovine embryos produced in vivo and in vitro: survival and fetal development. 1995. *Biol Reprod.* 52:676-682.
51. Fricke PM, Kirsch JD, Reynolds LP and Redmer DA. Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. *Theriogenology.* 1994;42(1):43-53.
52. Galina CS and Arthur GH. Review of cattle reproduction in the Tropics. Parte 1. Puberty and age at first calving. *Animal Breeding Abstracts.* 1989. 57(7):583.
53. Geary TW, Salverson RR and Whittier JC. Synchronization of ovulation using GnRH or hCG with the CO-Synch protocol in suckled beef cows. 2001. *Journal of Animal Science.* 79:2536-2541.
54. Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Reprod Fertil.* 1989. 87(1):223-30.
55. Goulding D, Williams DH, Duffy P, Boland MP and Roche JF. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology.* 1990; 34(4):767-78
56. Greve T, Callesen H, Hyttel P. et al. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology.* 1995, 43: 41-50.
57. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop PNF. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, v.37, p.139-168, 1987
58. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE and SA Trimmer (1995) Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results *Theriogenology* 43, 141-152
59. Hasler JF. The Holstein cow in embryo transfer to day as compared to 20 years ago. *Theriogenology.* 2006, 65: 4-16.
60. Hernández E, Mondragón I, Rivera J, Velázquez A. Influencias ambientales sobre algunas características reproductivas de un hato lechero en el oriente de Yucatán. *Mem Asoc Lat de Prod Anim México* 86 (1982).

61. Heyman, Y. and Chesné, P. 1984. Freezing bovine embryos: survival after cervical transfer of one half, one or two blastocysts frozen in straws. *Theriogenology*, 21:240.
62. Hill BR (1996) Ensayos a campo con embriones congelados con glicerol vs etilenglicol CABIA 27,30- 33.
63. Kafi M, McGowan MR. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci.* 1997 Aug;48(2-4):137-57.
64. Kanawaga, H. 1993. Bovine Embryo Transfer. Published by Japan International Cooperation Agency (JICA). Second printing, pp. 168.
65. King, K.K., Seidel, G.E.Jr. and Elsdén, R.P. 1985. Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. *Journal of Animal Science*, 61:747-757.
66. Kippax, I.S., Christie, W.B. and Rowan, T.G. 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology*, 35:25-35.
67. Lagomarsino, H.R., Castro, T y Visca, H. 1999. Calidad del cuerpo lúteo a la palpación rectal y preñez en un programa comercial de transferencia de embriones congelados. III Simposio Internacional de Reproducción Animal, pp. 217.
68. Leibo SP (1982) A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos In, *Proceedings 2nd International Congress of embryo transfer in mammals*, Annecy, France, IV, 18, 97
69. Leibo SP (1989) Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos *Theriogenology* 31, 85- 93.
70. Leibo, S.P. and Rall, W.R. 1987. Increase in production of pregnancies by bisection of bovine embryos. *Theriogenology*, 27:245.
71. Leibo SP and D Winninger (1986) Production of bovine pregnancies from embryos transported at 0°C by air *Theriogenology* 25, 165
72. Leibo SP and P Mazur (1978) Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing In, *Methods in Mammalian Reproduction*, (eds) Academic Press, New York, 179-201
73. Lerner, S.P., W.V. Thayne, R.D. Baker, T. Henschen, S. Meredith, E.K. Inskeep, R.A. Dailey, P.E. Lewis and R.L. Butcher. 1986. Age, dose of

- FSH and other factors affecting superovulation in holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 63: 176-183.
74. Lindner G and D Ellis (1985) Refrigeration of bovine embryos *Theriogenology* 23, 202
75. Lindner GM, Wright RW Jr. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 1983 Oct;20(4):407-16.
76. Lindner G, Anderson G, Bon Durant R, Cupps P and G Goemann (1982) Development of bovine embryos after storage at 4°C *Theriogenology* 17, 96
77. Lindsell CE, Murphy BD, Mapletoft RJ Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*. 1986 Aug;26(2):209-19
78. Ling ZJ, Shi DS, Huang HM, Wei YM, Jiang RM, Lu KH. Pregnancy rate following transfer of IVF bovine embryos at different developmental stages. *Theriogenology*. 1995, 43:(1)266-266.
79. Lohuis MM. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*. 1995, 43: 51-60.
80. López JR, Alfaro ME y Holy L. Respuesta superovulatoria en ganado bos indicus y bos taurus bajo condiciones tropicales, y efecto del desarrollo y calidad del embrión sobre el porcentaje de gestación. *Rev. Vet. Mex.*, 1995. 26(3):189-193.
81. Looney CR, Oden AJ, Massey JM, Johnson CA, Godke RA. Pregnancy rates following hCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology* 1984;21:246
82. Lucas-Hahn A and H Niemann (1991) In vitro survival of fresh and frozen/thawed bovine demiembryos *Theriogenology* 36,619-627.
83. Merton S, Van Wagtendonk-de Leew AM and Den Daas JHG. Factors affecting birthweight of IVP calves. 1998. *Theriogenology*. 49:293.
84. Mc Evoy TG and Sreenan JM. 1990. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of the zona pellucida-free demi-embryos. *Theriogenology*, 33:1245-1253.
85. Macmillan, W.H. and Donninson, M.J. 1999. Understanding maternal contribution to fertility in recipient cattle: Development of herds with contrasting pregnancy rates. *Anim. Reprod. Sci.*, 57:127-140.

86. Madalena, F.E., Abreu, F.E., Sampaio, I.B.M., Sobrinho, F.F., 1997. Practicas de cruzamentos em fazendas leiteiras afiliadas a` Cooperativa Central de Produtores Rurais de Minas Gerais. R. Bras. Zootec. 26, 924–934.
87. Madalena, F.E., 2001. A cadeia do leite no Brasil. In: Madalena, F.E, Matos, L.L., Holanda, E.V. (Eds.), Producao de Leite e Sociedade. FEPMVZ, Belo Horizonte, pp. 1– 26.
88. Mapletoft RJ, Steward KB and Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev.* 2002. 42(6):601-11.
89. Mapletoft, RJ, Lindsell, C.E. and Pawlyshyn, V. 1986. Effects of Clenbuterol, body condition and non-surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients. *Theriogenology*, 25:172.
90. Mapletoft, RJ, García, A. y González A. 1988. La transferencia de embriones en la vaca. *CADIA*, 11:41-50.
91. Mapletoft, RJ. 1989. La tecnología de la transferencia embrionaria 1ra. Parte. *Revista CABIA*, 17:45-65.
92. Markette KL, Seidel GE Jr, Elsdén RP. Embryonic loss after bovine embryo transfer. *Theriogenology*. 1980 Jan;13(1):105.
93. Martínez AG, Valcárcel A, de las Heras MA, de Matos DG, Furnus C and G Brogliatti (2002) Vitrification of in vitro produced bovine embryos, in vitro and in vivo evaluations *Anim Reprod Sci* 73, 11-21
94. Massip A, Van der Zwalmen P and F Ectors (1987) Recent progress in cryopreservation of cattle embryos *Theriogenology* 27, 69-79
95. Mazur P (1977) Slow-freezing injury in mammalian cells In, *The Freezing of Mammalian Embryos*, Elsevier, Excerpta Medica, Amsterdam pp, 19-48
96. Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, Kaal L, Vos PL, de Ruigh L, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 2003, 15;59(2):651-74.
97. Molina J.I. Aceptación de la técnica de transferencia de embriones bovinos en productores adscritos al programa para el mejoramiento genético de la ganadería del estado de Chiapas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. (2003).

98. Montiel F, Galina CS, Rubio I, Corro M (2006). Factors affecting pregnancy rate of embryo transfer in *Bos indicus/Bos taurus* cows. *J. Appl. Anim. Res.* 29: 149-152.
99. Morales TH, Aguilar CJ, Hinojosa CJ. Comportamiento reproductivo de un hato Holstein en la Chontalpa, Tabasco II. Periodo de gestación e intervalos entre partos. *Rev Vet Mex.* 14: 74-79 (1983).
100. Morales TH, Aguilar TJ, Hinojosa CJ. Comportamiento reproductivo de un hato Holstein en la Chontalpa, Tabasco 1. Intervalo parto primer servicio e intervalo parto concepción. *Rev Vet Mex.* 12: 217-221 (1981).
101. Munar C, Nigro M, Burry E y Vautier R (1988) Congelación y descongelación de embriones, principios de criopreservación y distintas técnicas CADIA 12,47-53
102. Munar C, Nigro M, Burry E y Vautier R (1988) Sincronización de celos en receptoras. CADIA, 12:54-59
103. Munar CJ and Hasler JF. 1989. Results of the first frozen bovine embryos exported from the USA to Argentina. *Theriogenology.* 31:(1):230.
104. Munar C, Valdez, AM y Crespo PJ (1998) Transferencia de embriones bovinos criopreservados con etilenglicol y con glicerol 1er Simposio Internacional de Biotecnologías Aplicadas en Reproducción Animal Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Buenos Aires, pp 108-114.
105. Munar, C.J., Nigro, M.A., Burry, E.R., Vautier, R.A. and Argerich, C. 1990. Quality control in a large-scale embryo transfer program under farm condition in the Argentine Republic. *Theriogenology*, 33:5-8.
106. Mutter, L.R., Graden, A.P. and Olds, D. 1964. Successful non-surgical bovine embryo transfer. *A.J. Digest*, 12:1150.
107. Nakagata N (1989) High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification *J Reprod Fert* 87, 479-483.
108. Newcomb IR and Rowson LAE Investigation of physiological factors affecting non-surgical transfer *Theriogenology*, 1980. 13:(1), 41-49.
109. Nibart M (1986) Congelation des embryons bovins, Interets et resultats pratiques In, Reports workshop on embryos and oocytes freezing Annecy, France pp, 215-222
110. Niemann H (1985) Freezing of bovine embryos, Effects of a one-step addition 1,4 M glycerol *Theriogenology* 23, 369-379

111. Niemann H (1991) Cryopreservation of ova and embryos from livestock, current status and research needs *Theriogenology* 35, 109-123
112. Niemann H, Brem G, Sacher B, Smidt D and H Krausslich (1986) An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos *Theriogenology* 25, 519-524
113. Niemann H, Sacher B, Schilling E and D Smidt (1982) Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method *Theriogenology* 17, 102
114. Overstrom EW, Duby RT, Dobrinsky JR, Robl JM, Baguisi A, Lonergan P, Duffy P, Walsh JH, Roche JF and MP Boland (1993) Cytoskeletal damage in vitrified and frozen embryos *Theriogenology* 39, 276
115. Palas AT and Mapletoft RJ. (1996) Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes, *Recent Advances Biotech Advances* 14, 127-149.
116. Pampillo, F. 1988. Siembra de embriones bovinos. *Revista CABIA*, 13:37-44.
117. Palma G, Burry E, Nigro M, Ezcurra D, Frers G, Witt A, Munar C y R Alberio (1998) Tasas de preñez después de la transferencia de embriones bovinos congelados con etilenglicol o glicerol Factores que las afectan Cuartas. Jornadas Nacionales CABIA y Primeras del MERCOSUR 207-213.
118. Palma, G.A. Transferencia de los embriones. En G.A. Palma & G. Brem Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 1ra. Edición 1993, 143-161.
119. Payas, A.J., Broadbent, P.J., Dolman, D.F. and Christie, W.B. 1989. Factors affecting pregnancy rate in embryo transfer recipients with reference to plasma progesterone. *Theriogenology*, 31:238.
120. Peeler ID, Nebel RL, Pearson RE, Swecker WS, and Garcia A. Pregnancy Rates After Timed AI of Heifers Following Removal of Intravaginal Progesterone Inserts. 2004. *Journal Dairy Science*. 87:2868–2873.
121. Pettit W (1985) Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules *Theriogenology* 23, 13-16
122. Picard L, Schneider U, Betteridge K and W King (1988) Effect of the zona pellucida, agar embedding, and culture on the survival of

micromanipulated bovine embryos after freezing and thawing J In vitro Fert Embryo Transfer 5, 268-274.

123. Pollard JW and SP Leibo (1994) Chilling sensitivity of mammalian embryos Theriogenology 41, 101-106
124. Prather R, Spire M and R Schalles (1987) Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos Theriogenology 28,195-204
125. Rall WF (1992) Cryopreservation of oocytes and embryos, Methods and applications Anim Reprod Sci 28,237-245
126. Rall WF and G Fahy (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification Nature 313,573-575
127. Reed, M.L., Roussel, J.D. and Seybt, S.H. 1985. Repeatability of blood serum progesterone levels in dairy heifers on day 7 of the estrous cycle. Theriogenology, 24:643-646.
128. Refsdal A, Kjaestad H and T Vatn (1988) Transfer of refrigerated bovine embryos In, Proceedings 11th International Congress on Animal Production and Artificial Insemination Dublin, Ireland pp 186
129. Renard J, Heyman Y and J Ozil (1981) Freezing bovine blastocysts with 12 propanodiol as cryoprotectant Theriogenology 15, 113
130. Renard J, Heyman Y and J Ozil (1982) Congélation de l'embryon bovin, Une nouvelle méthode de congélation pour le transfert cervical des embryons conditionnés une seule fois en paillettes Ann Med Vet 126, 23-32
131. Renard J, Heyman Y, Leyminie P and J Plat (1983) Sucrose dilution, a technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw Theriogenology 19, 145
132. Roa, N. 1996. Relación entre Concentraciones de Progesterona y la Tasa de Preñez en Receptoras de Embriones Bovinos. Tesis de Magister Scientiarum. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
133. Rorie RW, Pendleton RJ, Youngs CR and RA Godky (1986) Viability of demi-embryos produced before and after deep freezing Theriogenology 25, 192.
134. Rowe, R.F., Del Campo, M.R., Critser, J.K. and Ginther, O.J. 1980. Embryo transfer in cattle: Nonsurgical transfer. Am. J. Vet. Res., 41:1024-1028.

135. Saito, N. 1994. Chapter V. Transfer of embryos. Manual of embryo transfer & in vitro fertilization in cattle. ed. Saito, N., 36-46. National Livestock Breeding Center, MAFF, Japan.
136. Schmidt M, Smith SD, Avery B, Purwantara B and T Greve (1992) Coculture of bovine demiembryos prior to freezing *Acta Vet Scand* 33, 237-243.
137. Schneider U and P Mazur (1984) Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos *Theriogenology* 21, 68-79.
138. Schneider U and P Mazur (1986) Implications and applications of the long-term preservation of embryos by freezing In, Morrow DA, ed *Current Therapy in Theriogenology II*, Philadelphia, WB Saunders Co, pp 81-83
139. Seidel GE. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*. 1981, 211; 23: 351-357.
140. Seike, N., Sakai, M. and Kanagawa, H. 1991. Development of frozen-thawed demi-embryos and production of identical twin calves of different ages. *J. Vet. Med. Sci.*, 53:37-42.
141. Shea BF. 1981. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*, 15:31-42.
142. Sreenan, J.M. and Diskin, M.G. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in cow. *Theriogenology*, 27:99-113.
143. Sreenan, J. M. 1976. Egg transfer in the cow : Effect of site of transfer. *Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.*, III: 269-272.
144. Staigmiller, R.B., R.A. Bellows, G.B. Anderson, G.E.Jr. Seidel, W.D. Foote, A.R. Menino and R.W.Jr. Wright. 1992. Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. *Theriogenology*, 37: 1091-1099.
145. Suzuki T, Saha S, Sumantri C, Takagi M and A Boediono (1995) The influence of polyvinylpyrrolidone on freezing of bovine IVF blastocysts following biopsy *Cryobiology* 32, 505-510
146. Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T and M Kasai (1993) Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization *Mol Reprod Dev* 34, 266-271.
147. Takeda T, Hallowell SV, McCauley AD and Hasler JF. 1986. Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and non-surgically. *Theriogenology*, 25:204.

148. Takeda T, Elsdén RP and Seidel GE Jr (1985) Survival of cryopreserved bovine embryos cooled at 0.5 or 1°C/minute *Theriogenology* 23, 232.
149. Teodoro, R.L., Madalena, F.E., Lemos, A.M., Verneque, R.S. and Martinez, M.L. (2001). Cruzamento triplice de raças leiteiras: Avaliação de cruzamentos com Jersey e Pardo Suíço. 1. Produção e reprodução. In: Produção de Leite e Sociedade (Madalena, F.E., Matos, L.L. and Holanda Jr., E.V., eds.). Belo Horizonte, MG, Brazil, pp. 405-412.
150. Tervit H and R Elsdén (1981) Development and viability of frozen thawed embryos *Theriogenology* 15, 395-403
151. Thibier M and Nibart M. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*, 43:(1) 71-80.
152. Van der Zwalm P, Touati K, Ectors F J and A Massip (1989) Vitrification of bovine blastocysts *Theriogenology* 31, 270.
153. Van Wagtendonk-de Leeuw, A.M., den Daas, J.H.G. and Rall, W.F. 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and onestep dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, 48:1071-1084.
154. Voelkel SA and YX Hu (1992) Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos *Theriogenology* 37, 23-37.
155. Wenkoff, M. 1986. The effect of Clenbuterol on pregnancy rates in bovine recipients after nonsurgical transfer. *Theriogenology*, 25:214.
156. Wilkings JV, Ali JA, Vaca DC. El cruzamiento para la producción lechera en los llanos de Bolivia. En: Seminarios sobre cruzamientos de bovinos productores de leche en el trópico. El rol del animal cruzado en diferentes sistemas de producción. *Mem Asoc Lat Prod Anim* 7: 13 (1979).
157. Willadsen S (1977) Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing In, *The Freezing of Mammalian embryos Elsevier, Excerpta Medica, Amsterdam* pp, 175-201.
158. Wilmut I and L Rowson (1973) Experiments on the low temperature preservation of cow embryos *Vet Rec* 92, 686-690.
159. Wright JM. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*. 1981 Jan;15(1):43-56.
160. Wright J (1985) Commercial freezing of bovine embryos in straws *Theriogenology* 23,17-29.