



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
TESIS DOCTORAL

INCREMENTO DEL PORCENTAJE DE GESTACIÓN
EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS
DE APTITUD LÁCTEA MEDIANTE TRATAMIENTOS
HORMONALES DE SINCRONIZACIÓN Y
POSTRANSFERENCIA DE LA HEMBRA
RECEPTORA

SANTIAGO FUENTES IBÁÑEZ

2015

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS¹
(R.D. 99/2011, de 28 de enero y Normativa de la ULE)

El Dr. D. **Juan Carlos Domínguez Fernández de Tejerina** como Director² de la Tesis Doctoral titulada **“INCREMENTO DEL PORCENTAJE DE GESTACIÓN EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS DE APTITUD LÁCTEA MEDIANTE TRATAMIENTOS HORMONALES DE SINCRONIZACIÓN Y POSTTRANSFERENCIA DE LA HEMBRA RECEPTORA”**, realizada por D. **Santiago Fuentes Ibáñez** en el Departamento de **Sanidad Animal**, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a ____ de _____ de _____

D. Juan Carlos Domínguez Fernández de Tejerina

¹ Este impreso solamente se cumplimentará para los casos de tesis depositadas en papel.

² Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS¹
(R.D. 99/2011, de 28 de enero y Normativa de la ULE)

La Dra. Dña. **Ana Sierra Toral** como Director² de la Tesis Doctoral titulada **“INCREMENTO DEL PORCENTAJE DE GESTACIÓN EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS DE APTITUD LÁCTEA MEDIANTE TRATAMIENTOS HORMONALES DE SINCRONIZACIÓN Y POSTTRANSFERENCIA DE LA HEMBRA RECEPTORA”**, realizada por D. **Santiago Fuentes Ibáñez** en el Departamento de **Sanidad Animal**, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a ____ de _____ de _____

Dña. Ana Sierra Toral

¹ Este impreso solamente se cumplimentará para los casos de tesis depositadas en papel.

² Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS¹
(R.D. 99/2011, de 28 de enero y Normativa de la ULE)

El órgano responsable del programa de doctorado **Sanidad Animal y Reproducción** en su reunión celebrada el día ___ de _____ de _____ ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada **“INCREMENTO DEL PORCENTAJE DE GESTACIÓN EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS DE APTITUD LÁCTEA MEDIANTE TRATAMIENTOS HORMONALES DE SINCRONIZACIÓN Y POSTTRANSFERENCIA DE LA HEMBRA RECEPTORA**, dirigida por el Dr. D. **Juan Carlos Domínguez Fernández de Tejerina** y la Dra. Dña. **Ana Sierra Toral** y elaborada por D. **Santiago Fuentes Ibáñez**, y cuyo título en inglés es el siguiente **“INCREASED PERCENTAGE OF GESTATION IN EMBRYO TRANSFER OF DAIRY CATTLE THROUGH HORMONAL SYNCHRONIZATION AND POST TRANSFER TREATMENTS IN RECIPIENTS”**.

Lo que firmo, en León a ___ de _____ de _____.

El Secretario del Departamento/
Secretario de la Comisión Académica,

Fdo.: _____

CONFORMIDAD
El Director del Departamento/
Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.: _____

¹ Este impreso solamente se cumplimentará para los casos de tesis depositadas en papel.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis directores de Tesis, D. Juan Carlos Domínguez Fernández de Tejerina y Dña. Ana Sierra Toral, quienes me orientaron y brindaron todo su apoyo para que esta Tesis fuera posible. Gracias por todo el apoyo recibido, las miles de correcciones y todo el tiempo invertido en mí.

A Aberekin S.A. por darme la oportunidad de trabajar en este apasionante y maravilloso mundo del trasplante de embriones; poder trabajar con los primeros estadios de la vida es algo increíble, todos los días he disfrutado haciendo “pequeños milagros” llamados trasplantes de embriones. Un privilegio.

A los compañeros de trabajo que me han apoyado y ayudado en momentos difíciles.

A Eva Ugarte por su paciencia y su ayuda en la estadística.

A todas mis amistades que han estado muy cerca de mí, dándome ánimos para finalizar este proyecto.

A Feli Arrese, una gran persona que sabe escuchar y siempre tiene un buen consejo; su ayuda es inestimable.

A todos los ganaderos con los que he trabajado, por su confianza, su ayuda y por lo mucho que de ellos he aprendido; especialmente a Miguel Ortíz de Zárate, que confió en mí, me dio mi primer trabajo en la Asociación de ganado Frisón de Álava y la oportunidad de crecer en el mundo de la reproducción.

A mi hermano Rafael, por todos los cuidados que me brinda generosamente y por su gran paciencia, sin su ayuda, este proyecto hubiera tenido muchas más dificultades para llevarlo a término.

A Sylvia Aramendi por su apoyo incondicional.

A Paola Barahona Veterinaria de Chile, desde que se enteró de mi enfermedad, a pesar de la distancia, todos los días he tenido un mensaje de ánimo para seguir adelante.

Gracias a todos por vuestro apoyo.

"El agradecimiento es la memoria del corazón." – Lao-tse

DEDICATORIAS

A Mamen Pastor †, mi mujer. Desde que te conocí eres la luz que alumbra mi camino.

A mi madre, por todos los sacrificios que has tenido que hacer por mí.

A mis hijos Santi y Javi, por vuestra ayuda en los momentos más difíciles y por todo el amor que me dais.

A Julio de la Fuente †, maestro y un gran amigo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE GRÁFICAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
ÍNDICE DE FOTOS	XXIII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	XXVII
I.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	32
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	38
II.1.-Introducción.....	40
II.2.- Fisiología y Endocrinología de la reproducción en la hembra bovina	41
II.3.- Ciclo estral.....	46
II.3.1.- Fase folicular o estrogénica.....	47
II.3.2.- Fase luteal.....	48
II.4.- Dinámica Folicular	50
II.5.- Reconocimiento maternal de la gestación.....	53
II.6.- Técnica del trasplante de embriones <i>in vivo</i>	55
II.6.1.- Selección de donantes	57
II.6.1.1.- Criterios genéticos de selección.....	57
II.6.1.2.- Criterios no genéticos de selección.....	59
II.6.2.- Superovulación de donantes.....	60
II.6.3.- Colecta de embriones	60
II.6.4.- Búsqueda y manipulación de los embriones.....	63
II.6.4.1.- Valoración morfológica de los embriones por su estado de desarrollo.	64
II.6.4.2.-Clasificación de los embriones según su calidad	68
II.6.5.- Conservación de embriones y congelación.....	69

II.6.5.1.- Principios básicos de la congelación de embriones.....	70
II.6.5.2.- Crioprotectores.....	71
II.6.5.3.- Protocolo tradicional de congelación y descongelación de embriones enpajuelado, identificación y almacenamiento. ...	72
II.6.6.- Selección de receptoras.....	75
II.7.- Factores que afectan a la eficiencia del trasplante de embriones relacionados con la donante y la receptora.....	76
II.7.1.- Factores extrínsecos.....	76
II.7.1.1.- Medio ambiente.....	76
II.7.1.2.- Alimentación y manejo.....	78
II.7.2.- Factores intrínsecos relacionados con la donante.....	80
II.7.2.1.- Raza.....	80
II.7.2.2.- Edad.....	81
II.7.2.3.- Estado nutricional.....	83
II.7.2.4.- Estado sanitario.....	84
II.7.2.5.- Estado fisiológico.....	85
II.7.2.6.- Tratamientos de superovulación: métodos empleados.	86
II.7.2.7.- Superovulaciones continuadas de hembras donantes...	91
II.8.-Factores que afectan a la eficiencia del trasplante de embriones, relacionados con la receptora.....	92
II.8.1.- Raza.....	92
II.8.2.- Edad.....	92
II.8.3.- Estado nutricional.....	93
II.8.4.- Estado sanitario.....	94
II.8.5.- Tratamiento de sincronización: métodos empleados.....	95
II.8.5.1.- Sincronización del estro y de la ovulación. Tratamientos sin control de la onda folicular.....	95
II.8.5.2.- Tratamientos para controlar la onda folicular emergente y - o sincronizar la ovulación.....	98
II.8.5.2.1.-Procedimientos físicos; ablación del folículo dominante.....	98
II.8.5.2.2.-Métodos farmacológicos.....	98

II.8.5.2.2.1.- Utilización de GnRH y PGF: protocolo OVSYNCH	98
II.8.5.2.2.2.- Progestágenos / Progesterona	101
II.8.5.2.2.3.- Tratamientos de progesterona, estradiol, GnRH y PGF _{2α}	103
II.8.5.2.2.4.- Utilización de eCG y hCG en el tratamiento de sincronización de receptoras con dispositivos de progesterona.....	104
II.8.6.- Calidad del cuerpo lúteo y porcentajes de gestación.....	107
II.8.7.- Aspectos relacionados con el sincronismo donante-receptora	111
II.9.-Factores que afectan a la eficiencia del trasplante de embriones, relacionados con el embrión	112
II.9.1.- Calidad del embrión.....	112
II.9.2.- Estado de desarrollo del embrión	113
II.9.3.- Edad del embrión	115
II.9.4.- Crioconservación	115
II.10.- Factores que afectan a la eficiencia del trasplante de embriones relacionados con la aplicación de la técnica	117
II.10.1.- Mecanismos para colectar embriones.....	117
II.10.2.- Clasificación y manipulación de embriones	118
II.10.3.- Ubicación del embrión en el útero y experiencia del operador	119
II.10.4.- Protección del instrumental de transferencia.....	121
II.10.5.- Utilización de sedantes, anestesia epidural y/o relajantes uterinos.....	122
II.11.- Alternativas utilizadas con el fin de incrementar los porcentajes de gestación en la Transferencia de Embriones	122
II.11.1.- Aumentar los niveles de P ₄ en sangre.....	123
II.11.2.- Evitar la producción de prostaglandinas por el endometrio	126
II.11.3.- Otras vías alternativas utilizadas para incrementar los porcentajes de gestación	127

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	128
III.1.- Características generales de las explotaciones y de los animales	130
III.2.-Metodología de trabajo	132
III.2.1.- Donantes	132
III.2.2.- Tratamiento de superovulación	133
III.2.3.- Hormonas utilizadas en la superovulación.....	134
III.2.4.- Técnica de recolección de los embriones	135
III.2.5.- Tratamiento de los embriones: determinación del estado de desarrollo y la calidad.....	137
III.2.6.- Congelación de embriones y crioprotectores utilizados....	139
III.2.7.- Descongelación de embriones	142
III.2.8.- Técnica de implantación de los embriones a la receptora.	143
III.2.9.- Hembras receptoras	145
III.2.10.- Selección de las hembras receptoras	145
III.2.11.- Hormonas y productos farmacológicos usados en la sincronización de las receptoras y en los tratamientos postransferencia	145
III.2.12.- Tratamientos de sincronización de receptoras	146
III.2.13.- Determinación de la calidad del cuerpo lúteo	151
III.2.14.- Tratamientos utilizados postransferencia, para mejorar la fertilidad.....	155
III.3.- Diseño experimental	157
III.4.- Análisis estadístico	159
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	162
IV.1.- Experimento1: Tratamientos de sincronización de receptoras, tipo de embrión, estado de desarrollo del embrión y calidad del cuerpo lúteo	164
IV.1.1.- Tratamientos de sincronización de receptoras	164
IV.1.2.- Tipo de embrión	170
IV.1.3.- Estado de desarrollo del embrión.....	177

IV.1.4.- Calidad del Cuerpo Lúteo por exploración manual.....	180
IV.2.- Experimento 2: Tratamientos de postransferencia para mejorar los porcentajes de gestación	184
IV.2.1.- Tratamiento postransferencia 1: DP ₄ -7.....	184
IV.2.2.- Tratamiento postransferencia 2. DP ₄ -7+ GnRH.	188
IV.2.3.- Tratamiento postransferencia 3: FM7.....	194
V.- CONCLUSIONES.....	198
VI.- RESUMEN	202
VII.-SUMMARY	208
VIII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	214
IX.- ANEXOS	246
Anexo IX.1.:Fichas de prtocolos de trabajo y certificado	248
Anexo IX.2.:Fichas de registro de prospectos	260

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Producción y transferencia de embriones in vivo en el mundo en 2013 (IETS 2014).....	40
Tabla 2.	Producción y transferencia de embriones <i>in vitro</i> en el mundo en 2013 (IETS 2014).....	41
Tabla 3.	Porcentaje de transferencias de embriones in vivo congelados e <i>in vitro</i> en fresco en las distintas regiones, en 2013, que aportan datos a la IETS. (IETS 2014).....	41
Tabla 4.	Promedio de embriones transferibles según el intervalo entre tratamientos. (Cabodevila J, Torquati S, 2008).	91
Tabla 5.	Efecto de la condición corporal de la receptora sobre el porcentaje de preñez después de la transferencia no quirúrgica, Mapletoft y col. (1986)	94
Tabla 6.	Porcentajes de novillas seleccionadas como receptoras de embriones y porcentaje de gestación, utilizando receptoras de embriones transferidas a los 7 días de la observación de celos naturales o inducidos por diferentes tratamientos de sincronización. Adaptado de Fuentes and de la Fuente, (1997).	106
Tabla 7.	Efecto de la calidad del CL, estimada por tamaño y consistencia a la palpación, sobre el porcentaje de gestación de receptoras en TE (Cutini et al. 2000).....	109
Tabla 8.	Efecto de la calidad de embriones producidos in vivo y trasferidos en fresco sobre el porcentaje de preñez (Cutini et al. 2000).....	112
Tabla 9.	Efecto de la calidad de embriones producidos in vivo previo a la congelación sobre el porcentaje de preñez (Cutini, et al. 2000).....	112
Tabla 10.	Porcentajes de preñez obtenidos según estado de desarrollo de embriones bovinos de acuerdo con distintos autores consultados. Valores con superíndices diferentes dentro de cada autor difieren en $P < 0,05$	114
Tabla 11.	Porcentajes de preñez obtenidos con protección o no del instrumental de transferencia mediante vaina desechable estéril.....	121
Tabla 12:	Experimento 1. Grupos de tratamientos de sincronización de receptoras y tipo de embrión.....	157
Tabla 13:	Experimento 1. Grupos de tratamientos de sincronización de receptoras y estado de desarrollo del embrión	158
Tabla 14:	Experimento 1. Grupos de tratamientos de sincronización de receptoras y calidad de CL por exploración manual excluyendo las receptoras del grupo 3 con tratamientos de superovulación, así como las ecografiadas	158
Tabla 15:	Experimento 2. Tratamientos utilizados postransferencia, después de los tratamientos de sincronización de receptoras para mejorar la fertilidad	159
Tabla 16:	Total de transferencias realizadas en este estudio experimental y porcentajes de gestación alcanzados, teniendo en cuenta el tipo de embrión.....	164

Tabla 17. Porcentaje de gestación global obtenido en las 2.250 hembras receptoras en el experimento 1	165
Tabla 18. Grupo 1. Tratamientos de sincronización de receptoras sin control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación.....	165
Tabla 19. Grupo 2. Tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación.....	166
Tabla 20. Grupo 3. Tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y con superovulación	167
Tabla 21. Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3. Total tratamientos de sincronización de receptoras con y sin control farmacológico de la onda folicular y con o sin superovulación.....	170
Tabla 22. Total embriones transferidos en función del tipo de embrión, en el experimento 1.....	171
Tabla 23. Grupo 1. Porcentajes de gestación obtenidos en el grupo de tratamientos de sincronización de receptoras sin control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación según el tipo de embrión transferido	172
Tabla 24. Grupo 2. Tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación.....	173
Tabla 25. Grupo 3. Tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y con superovulación.....	174
Tabla 26. Porcentajes de gestación según el estado de desarrollo de los embriones en el experimento 1	178
Tabla 27: Resultados de gestación en función del estado de desarrollo y tipo de embrión.....	179
Tabla 28. Porcentajes de gestación obtenidos en función de la calidad del CL determinado por exploración manual vía rectal y el tipo de embrión (FRE, GLI, ETG)	181
Tabla 29. Tratamiento postransferencia 1. DP ₄₋₇ en receptoras del grupo 1 de tratamientos de sincronización	184
Tabla 30. Tratamiento postransferencia 1. DP ₄₋₇ en receptoras del grupo 3 de tratamientos de sincronización	185
Tabla 31. Total tratamientos de sincronización de receptoras sin y con tratamiento postransferencia 1 DP ₄₋₇	186
Tabla 32. Tratamiento postransferencia 2 DP ₄₋₇ + GnRH en receptoras del grupo 1 y 2 de tratamientos de sincronización y no superovuladas.....	189
Tabla 33. Tratamiento postransferencia 2 (DP ₄₋₇ + GnRH) en receptoras del grupo de tratamientos de sincronización y superovuladas	190
Tabla 34. Total tratamientos de sincronización de receptoras sin y con tratamiento postransferencia 2 (DP ₄₋₇ + GnRH).....	191
Tabla 35. Tratamiento postransferencia 3: FM7 en receptoras no superovuladas y superovuladas	195

ÍNDICE DE GRÁFICAS

ÍNDICE DE GRAFICAS

	Página
Gráfica 1: Porcentajes totales de gestación en función del tipo de embrión transferido.....	171
Gráfica 2: Grupo 1. Porcentajes de gestación obtenidos en los tratamientos de sincronización de receptoras sin control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación teniendo en cuenta el tipo de embrión transferido.....	173
Gráfica 3: Grupo 2. Porcentajes de gestación obtenidos en los tratamientos de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación teniendo en cuenta el tipo de embrión transferido..	174
Gráfica 4: Grupo 3. Porcentajes de gestación obtenidos en los tratamientos de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y superovulación, teniendo en cuenta el tipo de embrión transferido ...	175
Grafica 5: Porcentajes de gestación según el estado de desarrollo de los embriones en el grupo de tratamientos de sincronización de receptoras	178
Grafica 6: Porcentajes de gestación según la calidad del CL por exploración manual	182
Grafica 7: Porcentajes de gestación entre el grupo 1 y el tratamiento postransferencia 1 (DP ₄₋₇), en función del tipo de embrión	185
Grafica 8: Porcentajes de gestación entre el grupo de tratamientos de sincronización de receptoras 3 (receptoras superovuladas) y el tratamiento postransferencia 1 (DP ₄₋₇).....	186
Gráfica 9: Porcentajes totales de gestación entre receptoras superovuladas y no superovuladas, (grupos 1 y 3) y el tratamiento postransferencia 1 (DP ₄₋₇).....	187
Gráfica 10: Porcentajes de gestación entre el el tratamiento postransferencia 2 (DP ₄₋₇ +GNRH) y el grupo de tratamientos de sincronización 1, en función del tipo de embrión.....	192
Gráfica 11: Porcentajes de gestación entre el tratamiento postransferencia 2 (DP ₄₋₇ +GNRH) y el grupo de tratamientos de sincronización 2, en función del tipo de embrión.....	192
Gráfica 12: Porcentajes de gestación entre el grupo control 3 y el tratamiento postransferencia 2 (DP ₄₋₇ +GNRH).....	193

Gráfica 13: Porcentajes totales de gestación entre receptoras superovuladas y no superovuladas, (grupos 1, 2 y 3) y el tratamiento postransferencia 2 (DP₄-7 + GNRH).....194

Gráfica 14: Porcentajes de gestación entre el tratamiento postransferencia 3 y el tratamiento de sincronización de receptoras del grupo 1 B (Prostaglandinas) y el tratamiento de sincronización de receptoras del grupo 3, con superovulación G (P₄E₂+1.000 U.I. eCG) en función del tipo de embrión.....196

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema simplificado de las interrelaciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero.....	42
Figura 2: Mecanismo de acción de las principales hormonas reproductivas sobre los ovarios y útero de las hembras bovinas.....	42
Figura 3: Principales acciones de las hormonas gonadotropinas (LH y FSH) sobre las gónadas de la hembra bovinas	43
Figura 4: Mecanismo de transporte de la prostaglandina F2 α en el tracto genital de la vaca (Dyce, 1999).....	46
Figura 5: Evolución hormonal en el ciclo estral de la vaca (UCCL, 2012).....	47
Figura 6: Estructuras ováricas en la hembra bovina a lo largo de las distintas etapas de su ciclo estral.....	49
Figura 7: Representación de los niveles de las distintas hormonas y estructuras ováricas a lo largo de las fases del ciclo estral en las vacas.....	49
Figura 8: Dinámica folicular : dos ondas de crecimiento folicular	50
Figura 9: Modelo esquemático de tres ondas de crecimiento folicular y desarrollo del cuerpo lúteo en bovinos.....	51
Figura 10: Patrón de tres ondas de crecimiento de los folículos ováricos (Paul and Randy, 2008).....	52
Figura 11: Mecanismo de acción del IFN τ en contacto con el epitelio uterino.....	54
Figura 12: Principales etapas de la transferencia embrionaria en ganado vacuno.....	56
Figura 13: Esquema del procedimiento de recolección de embriones.....	62
Figura 14: Esquema de recolección de embriones bovinos, técnica no quirúrgica. Recolección con introducción del PBS con jeringa y recolección con introducción del PBS por gravedad. (Adaptado por Fuentes y de la Fuente).....	63
Figura 15: Valoración morfológica del estado de desarrollo de los embriones.....	65
Figura 16: Efecto de la velocidad de congelación y la tasa de supervivencia.....	71
Figura 17: Empajuelado del embrión.....	73
Figura 18: Identificación del embrión.....	73
Figura 19: Curva de congelación	74

Figura 20: Sistema para almacenar los embriones.....	75
Figura 21: Puntos anatómicos a tener en cuenta para evaluar la condición corporal del ganado vacuno así como distintas imágenes de vacas que muestran diferente condición corporal.....	79
Figura 22: Evolución de la producción de leche, peso vivo, capacidad de ingestión y momento óptimo de superovulación según condición corporal (Fuentes, S. and de la Fuente, J).....	86
Figura 23: Distribución de los celos tras la aplicación de prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α}) (Mialot <i>et al.</i> 1999).....	96
Figura 24: Métodos tradicionales de sincronización de receptoras. Adaptado de (Fuentes and de la Fuente, 2007).....	97
Figura 25: Distribución de los celos tras la aplicación del método Ovsynch [GnRH (PGF _{2α}) GnRH] (Mialot <i>et al.</i> 1999).....	99
Figura 26: Protocolo Ovsynch para TETF.....	100
Figura 27: Protocolo de sincronización combinado CIDR-Co-Synch + 56 h ITF, adaptado para novillas. Adaptado de (Domínguez <i>et al.</i> 2008).....	100
Figura 28: Protocolo de tratamiento para TETF programa Ovsynch + P ₄	100
Figura 29: Método Ovsynch y variable con dispositivo intravaginal de P ₄ de 12 días (Fuentes and Liébana, 2012).....	101
Figura 30: Método “RESET” de sincronización de receptoras (Fuentes <i>et al.</i> 1997).....	105
Figura 31: Probabilidad de preñez en receptoras de embriones basado en el diámetro del CL (Nogueira <i>et al.</i> 2012).....	109
Figura 32: Maniobras a realizar para alcanzar el cuerno uterino para lograr la implantación del embrión en la hembra receptora. Técnica no quirúrgica .	121
Figura 33: Mapa geográfico de España. Localización de las explotaciones estudiadas.....	130
Figura 34: Embriones aptos y no aptos en función de la integridad de la membrana pelúcida y de la suciedad adherida a esta.....	137
Figura 35: Estado de desarrollo del embrión y códigos según la IETS.....	138
Figura 36: Calidad del embrión y códigos I.E.T.S.....	139
Figura 37: Empajuelado del embrión.....	141
Figura 38: Identificación del embrión.....	141
Figura 39: Curva de congelación y biocongelador.....	142
Figura 40: Almacenamiento de los embriones.....	142

Figura 41: Sincronización de receptoras. Celos naturales.....	147
Figura 42: Sincronización de receptoras. Prostaglandinas.....	147
Figura 43: Sincronización de receptoras. PRID completo con cápsula de Benzoato de Estradiol.....	147
Figura 44: Sincronización de receptoras. P ₄ -12+GnRH.....	148
Figura 45: Sincronización de receptoras. P ₄ -12+GnRH + 500 U.I. de eCG.....	148
Figura 46: Sincronización de receptoras. P ₄ -12+GnRH +75 U.I. de Pluset.....	149
Figura 47: Sincronización de receptoras. PRID +P ₄ + E ₂ +1.000 U.I. de eCG.....	149
Figura 48: Sincronización de receptoras. PRID + P ₄ + E ₂ + 750 U.I. de eCG.....	150
Figura 49: Sincronización de receptoras. PRID + P ₄ + E ₂ +Pluset en dosis partida....	150
Figura 50: Sincronización de receptoras. CIDR + GnRH + 750 U.I. de eCG.....	151
Figura 51: Tratamiento postransferencia 1. DP ₄ -7.....	155
Figura 52: Tratamiento postransferencia 2. DP ₄ -7 + GnRH.....	156
Figura 53: Tratamiento postransferencia 3. FM7.....	156

ÍNDICE DE FOTOS

ÍNDICE DE FOTOS

	Página
Foto 1: Imágenes de vacas de producción láctea en celo.....	48
Foto 2: Dos vacas de alto valor genético, hijas de madre nacional, nacidas de trasplante de embriones, y madres de sementales	59
Foto 3: Aplicación anestesia epidural ganado vacuno.....	62
Foto 4: Sondas Foley, cateter Neustadt Aisch (Rush) y sonda desechable de silicona para recolección de embriones bovinos	62
Foto 5: PBS de 2 litros, filtro de embriones (Em-Con) y sistema de tuberías en “Y”...	63
Foto 6: Filtros, micropipetas, placas Petri y microaspirador para empajuelar	64
Foto 7: Estación de trabajo para búsqueda de embriones bovinos.....	64
Foto 8: Mórula sin compactar.....	66
Foto 9: Mórula compactada.....	66
Foto 10: Blastocisto joven (temprano).....	67
Foto 11: Blastocisto, (Julio de la Fuente).....	67
Foto 12: Blastocistos expandidos.....	67
Foto 13: Blastocisto expandido eclosionando y blastocisto expandido eclosionado.....	68
Foto 14: Manipulación de embriones bovinos.....	68
Foto 15: Vacas Frisonas y vaca Brahman sujetas a condiciones de estrés por calor.....	76
Foto 16: Vacas <i>Bos indicus</i> y <i>Bos taurus</i> (aptitud lechera y cárnica).....	80
Foto 17: Ejemplares de novilla y vacas de raza Frisona.....	81
Foto 18: Ejemplos de vacas con distintas condiciones corporales en el posparto.....	83
Foto 19: Aspectos sanitarios relativos al embrión, la donante y la ganadería.....	85
Foto 20: Imagen de un ovario de vaca (día 8), superestimulado por la acción de las gonadotropinas.....	88
Foto 21: Visión ecográfica de un ovario estimulado con gonadotropinas inyectables...	90
Foto 22: Imagen ecográfica de ovarios de vaca donde se pueden ver folículos anecogénicos, esféricos, de tamaños varios y en número variable.....	90
Foto 23: Ablación del folículo dominante por ecografía.....	98
Foto 24: Implantes y dispositivos utilizados en la UE para la aplicación de progestágenos y progesterona.....	101
Foto 25: Imagen ecográfica de dos CL de hembra bovina.....	108

Índice de fotos

Foto 26: Secuencia del proceso de descongelación y TD de embriones.....	120
Foto 27: Ovarios superovulados. Día 8.....	135
Foto 28: Recolección de embriones con pequeños volúmenes.....	136
Foto 29: Recolección de embriones con sonda Rüşh y pequeños volúmenes.....	136
Foto 30: Set de tuberías, filtro para embriones, placas de petri para búsqueda, clasificación y lavado de los embriones, micropipeta para manejar los embriones	137
Foto 31: Catéter IVF con jeringa para lavado de embriones y placa de 12 pocillos.....	137
Foto 32: Embriones de distinta calidad.....	139
Foto 33: Dos microaspiradores diferentes para introducir los embriones en las pajuelas.....	140
Foto 34: Biocongelador de embriones, SY-LAB® modelo Cryocel 1200.....	142
Foto 35: Anestesia Epidural.....	144
Foto 36: Inyectores numerados.....	144
Foto 37: Vaina y funda sanitaria.....	144
Foto 38: Vulva limpia e introducción del inyector.....	144
Foto 39: Ecografía de ovarios de receptora superovulados. Día 7.....	150
Foto 40: Ovario con CL, día 6 del ciclo.....	152
Foto 41: Ecógrafo Easi Scan (BCF Technology Ltd.....	152
Foto 42: Ovarios día 6 del ciclo, con una sección del CL.....	153
Foto 43: Ovarios día 6 del ciclo, con una sección del CL.....	153
Foto 44: Ovarios día 7 del ciclo, con una sección del CL.....	154
Foto 45: Ecografía de CL de buena calidad. Ovario día 7 del ciclo.....	154
Foto 46: Ecografías de CL; día 7 del ciclo.....	155

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AETE:** Asociación Europea de Trasplante de Embriones
AINE: Antiinflamatorio no esteroideo
ANFE: Asociación Nacional Frisona Española
B₂: Benzoato de Estradiol
BLUP: Mejor predictor lineal insesgado
BSA: Albúmina sérica bovina
BVD: Diarrea vírica bovina
CC: Condición corporal
CIDR: Dispositivo de progesterona de liberación
(*Controlled internal Drug release*)
CL: Cuerpo lúteo
CONAFE: Confederación Nacional Frisona Española
DIV: Dispositivo intravaginal liberador de progesterona
E₂: 17 β-estradiol
eCG: Gonadotropina coriónica equina
ETG: Embriones congelados en etilenglicol
FD: Folículo dominante
FIV: Fecundación *in vitro*
FM: Flunixin meglumine
FS: Folículo secundario
FRE: Transferencia de embriones en fresco
FSH: Hormona folículo estimulante
GICO: Índice genético combinado
GLI: Transferencia de embriones congelados en Glicerol
GnRH: Gonadoliberina: hormona liberadora de gonadotropinas
GPG: GnRH – PGF_{2α} – GnRH (método Ovsynch)
hCG: Gonadotropina Coriónica humana
hMG: Gonadotropina menopausica humana
IA: Inseminación artificial
IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo
IBR: Rinotraqueitis Infecciosa Bovina
ICO: Índice combinado de producción y tipo
IETS: Sociedad Internacional de Trasplante de Embriones
IGF-I, -II: Factor de crecimiento con actividad insulínica tipos I y II
IMV: IMV-Technologies®
i.m.: Inyección intramuscular
INF-τ: Interferón tau
INTERBULL: International Bull Evaluation Service
LH: Hormona luteinizante
OIE: Oficina Internacional de Epizootias
OPU: Ovum Pick Up. Punción de los folículos mediante aguja guiada por ecografía y aspiración del ovocito para fecundación *in vitro*
OT: Oxitocina
PBS: Fosfato Bufer Salino
P₄: Progesterona
PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}

PRID®: Dispositivo intravaginal liberador de progesterona

RE: Receptores para estrógenos

RMG: Reconocimiento maternal de la gestación

mRNA: RNA mensajero

ROT: Receptores para la oxitocina

s.c.: Inyección subcutánea

SNP_s: Polimorfismos de un solo nucleótido

TD: Transferencia directa de embriones

TE: Trasplante de Embriones

TETF: Trasplante de embriones a tiempo fijo

TRA: Transferencias

TSH: Hormona estimulante del tiroides

UE: Unión Europea

UNIFEED: Sistema de alimentación con raciones completas en carro mezclador

USA: Estados Unidos de Norteamérica

VGD: Valor genómico directo

I.-INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



I.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El trasplante de embriones (**TE**) es la biotecnología de la reproducción que más impacto ha tenido en la genética del ganado vacuno Holstein a nivel mundial. Desde el punto de vista de la producción animal, el objetivo fundamental del TE es la mejora genética, ya sea mediante la vía hembra, para conseguir hembras de gran valor genético, como por la vía macho, consiguiendo sementales para los programas de testaje en descendencia, para lo cual es preciso conocer el valor genético, tanto de la hembra a superovular, como del semental a utilizar. Este conocimiento del valor genético, es siempre una predicción del valor genético real del animal y con la inclusión de la tecnología genómica en los programas de mejora genética, se consigue un aumento considerable de la fiabilidad (sirva de ejemplo que animales con pocos días de vida, tienen una fiabilidad aproximada del 70%, dependiendo del carácter, frente a los índices de pedigrí, que es del 45-50%), lo que produce un gran cambio en los programas de selección tradicionales y nos permite conseguir un incremento del progreso genético.

Todos los programas de mejora genética están basados en el uso del TE, hecho que se pone de manifiesto en la valoración genética del International Bull Evaluation Service (**INTERBULL**) de agosto de 2015 en base genética de Estados Unidos de Norte América (**USA**), en la que el 89 de los 100 mejores sementales Holstein del Mundo han sido producidos por TE; y el resto, aunque no lo son, al menos uno de sus progenitores es fruto del TE (<http://www.holsteinusa.com> 2015).

En 1988 la Asociación Nacional Frisona de España (**ANFE**), actualmente Confederación de Asociaciones de Frisona Española (**CONAFE**), publica el primer catálogo de sementales con datos genéticos de producción y tipo utilizando la metodología más precisa existente en ese momento, el método “**BLUP**” (mejor predictor lineal insesgado), Modelo Animal, (Pena *et al.*, 1992). Esta evaluación se realiza dos veces al año, tanto para sementales como para hembras. Es en este momento, cuando en España, con un conocimiento más preciso del valor genético de las donantes y sementales, aparece una demanda de trasplante de embriones, tanto por parte de los ganaderos, como por parte de centros de inseminación privados, que hacía pocos años habían iniciado su andadura.

Desde el punto de vista de la transmisión de enfermedades, el TE es la forma más económica y segura de intercambio de genética, por encima incluso del semen, siempre que los embriones hayan sido obtenidos, procesados y almacenados por un equipo autorizado y se sigan estrictamente los protocolos sanitarios recomendados por la Sociedad Internacional de Trasplante de Embriones (**IETS**) (Warthall and Suttmöller, 2000).

Durante todos estos años, el TE en España ha ido desarrollándose poco a poco, aumentando tanto el número de ganaderos que lo utilizan, como el de veterinarios que practican esta técnica y ha producido no solo hembras con una excelente genética para mejorar la rentabilidad de las ganaderías, sino también excelentes sementales que han contribuido a un aumento considerable del progreso genético, así desde 1992 hasta 2014 se han registrado en CONAFE 8.763 hembras y 4.874 sementales procedentes de TE, (CONAFE 2015); sin embargo, según las estadísticas de la Asociación Europea de Trasplante de Embriones (**AETE**), la actividad de TE en España fue de 575 colectas en 2014, muy por debajo de países punteros de la Unión Europea (**UE**), como Francia,



Alemania, Holanda, e Italia, con 6.859, 2.904, 5.220 y 2.218 colectas respectivamente, competidores nuestros en la industria láctea y en genética (AETE 2015).

La AETE señala en 2014, que en la transferencia de embriones *in vivo*, se realizaron 22.490 colectas que produjeron 138.418 embriones transferibles con una media de 6,2 embriones por colecta. Y si hablamos de embriones *in vitro* (**FIV**), se produjeron durante ese mismo año. 17.062 embriones, de los cuales 15.693 fueron producidos en 9.710 sesiones de aspiración folicular (**OPU**), lo que da una media de 1,6 embriones por sesión de OPU y a partir de ovarios de matadero, se produjeron 1.369 embriones transferibles *in vitro*.

Con respecto a las transferencias, según las estadísticas de la AETE, se han transferido en total 137.802 embriones; de los cuales, 123.380 (89,53%), fueron embriones producidos *in vivo*, y 14.422 (10,47%), fueron embriones producidos *in vitro*. De los embriones producidos *in vivo*, 59.546, se transfirieron en fresco y congelados-descongelados, 63.834 (48,26% vs. 51,77%, respectivamente). De los embriones producidos *in vitro*, 11.430 fueron transferidos en fresco y congelados descongelados 2.992 (79,25% vs. 20,75%, respectivamente) (AETE 2015).

Con los avances que se están produciendo en la tecnología genómica, el genotipado de embriones es ya una realidad, así en 2014 Francia, Holanda y Alemania han sexado y genotipado 1.472 embriones producidos *in vivo* para sus programas de mejora genética (AETE, 2015), esto supone un gran progreso genético ya que la toma de decisiones sobre la genética de un semental se realiza en el embrión, sin tener que esperar al nacimiento del mismo, consiguiendo un considerable aumento de la presión de selección, y una reducción del intervalo generacional.

Tradicionalmente, otras utilidades del TE son la conservación de especies en vías de extinción y el comercio de genética, posible gracias a la congelación de los embriones que nos permite conservarlos prácticamente de forma indefinida, con porcentajes de supervivencia posdescongelación superiores al 95%, y porcentajes medios de gestación esperados superiores al 50% (Fuentes and de la Fuente, 2011). Sin embargo, esta técnica también puede ser utilizada para mejorar la fertilidad en hembras bovinas, especialmente de vacas lecheras lactantes, ya que estos animales tienen una mayor mortalidad embrionaria antes del día 5 a 7 de la gestación que las hembras no lactantes (Rizos *et al.*, 2010); o durante etapas en las que sufren estrés por calor, ya que el embrión adquiere pronto mecanismos bioquímicos que lo protegen de las temperaturas elevadas (Hansen, 2013), o en el caso de vacas repetidoras, como apuntan los trabajos realizados por Son *et al.* (2007) y Block *et al.* (2010), donde indican que los porcentajes de preñez de las vacas repetidoras son mayores después de la transferencia de embriones, que después de la inseminación artificial.

Básicamente el TE se compone de dos procesos, por un lado la obtención de los embriones, (para lo cual es preciso la superovulación de la donante, la recolección de los embriones, la determinación de su calidad y la congelación), y por otro lado, la transferencia de los embriones a las receptoras, (que comprende la sincronización y selección de las receptoras, la determinación de la calidad de su cuerpo lúteo (**CL**) y finalmente, la transferencia del embrión propiamente dicha a la receptora).



El éxito de un programa de transferencia de embriones se mide por el número de descendientes que nacen vivos por hembra donante en un determinado periodo de tiempo (Bó *et al.*, 2013), sin embargo, hay una gran variabilidad en los resultados finales ya que existen numerosos factores que pueden afectar al éxito final de la técnica y los podemos encontrar en tres niveles: aquellos que dependen de la donante y la superovulación, los que dependen del embrión, y finalmente, los que dependen de la receptora y la transferencia.

Los factores más importantes asociados a la donante y la superovulación son: la raza, aspectos genéticos, la edad, el número de parto, intervalo parto-superovulación, nivel de producción, el estado de salud de la donante y su estado nutritivo, en especial su condición corporal.

Debemos señalar que el control de la onda folicular en los protocolos de superovulación (Adams 1994; Bó *et al.*, 1995b, Fuentes and de la Fuente, 2000; Bó *et al.*, 2010), ha supuesto un gran avance en la técnica del TE, ya que nos permite iniciar el tratamiento con gonadotropinas en el momento de la emergencia de la nueva onda folicular y ha eliminado la necesidad de la detección de celos en las donantes, lo que facilita su manejo (Mapletoft and Bó, 2013).

Y por otro lado, los aspectos genéticos están teniendo cada día más relevancia, con el desarrollo de la genómica, se han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido relacionados con el número de folículos reclutados en cada onda folicular y en el número de ovocitos recuperados por aspiración folicular (Santos-Biase *et al.*, 2012).

Con respecto a los factores que dependen del embrión, se ha demostrado que la calidad del embrión así como el tipo de transferencia, en fresco o congelado-descongelado, son los aspectos que más significativamente influyen en los porcentajes de gestación (Hasler 2001; Bó *et al.*, 2012b).

Las receptoras son el último y definitivo paso de un complejo proceso, un punto crítico en el que todos los gastos de la técnica se van a aplicar a la receptora gestante (Beal and Hinshaw, 2000); es evidente que cuantas más receptoras reciban un embrión y queden gestantes, el coste de esta técnica disminuye, por ello, en la hembra receptora debemos controlar todos los aspectos descritos para las donantes, incluido el control de la onda folicular emergente y otros aspectos importantes como son los relativos al tipo de receptora (las novillas tienen porcentajes de gestación significativamente superiores a las vacas en lactación) (Hasler 2001). Por último, señalamos que la eficaz detección del celo y la determinación de la calidad del CL en estas hembras, son dos puntos críticos en esta tecnología, ya que nos van a indicar cuándo hay que transferir el embrión y si la receptora es apta o no para la transferencia.

Los gastos de mantenimiento, sincronización y retrasos hasta la gestación y el parto de las receptoras no aptas para la transferencia, además del tiempo invertido en la detección de los celos, son elevados, por lo cual es importante disponer de tratamientos de sincronización que nos proporcionen el máximo número de receptoras aptas para la transferencia. Con la posibilidad del control farmacológico de la onda folicular, del celo y la ovulación, se han diseñado tratamientos de superovulación de receptoras que permiten una alta utilización de receptoras sincronizadas, así como el trasplante de embriones a tiempo fijo (**TETF**) sin necesidad de detección de celos. (Fuentes and de la



Fuente, 1997; Fuentes 2000; Baruselli *et al.*, 2001; Tribulo *et al.*, 2002; Looney *et al.*, 2010). Por otra parte, los protocolos Ovsynch y sus variantes, aunque no conllevan la superovulación de las receptoras, obtienen una alta utilización de éstas. (Bó *et al.*, 2002; Bó *et al.*, 2004a).

Con respecto a la transferencia propiamente dicha, la experiencia del profesional que transfiere el embrión es importante; el realizar una transferencia limpia, sin hacer daño y depositando el embrión en el lugar apropiado, es determinante para tener mejores porcentajes de gestación (Ponsart *et al.*, 2000; Hasler, 2001).

Como podemos ver, son muchos los factores relacionados con el TE que van a afectar a los resultados, es decir, a la obtención del máximo número posible de gestaciones y de descendientes. Este trabajo experimental, realizado con la información obtenida en 25 años de trabajo en un programa comercial de trasplante de embriones en ganado vacuno de raza Frisona, pretende plantear diseños experimentales con objeto de hacer más efectiva la técnica al intentar aumentar los porcentajes de gestación de las hembras receptoras en un programa de trasplante de embriones:

1. Basándonos en que existe una relación positiva entre el tamaño del CL y la producción de P₄ (Ponsart *et al.*, 2000; Binelli *et al.*, 2001; Baruselli *et al.*, 2001), hemos diseñado tratamientos de sincronización de receptoras con el objetivo de aumentar la producción de P₄, ya sea produciendo un CL más grande o mediante la superovulación de receptoras para tener más cuerpos lúteos y consecuentemente, más P₄.
2. Así mismo, se han diseñado tres tratamientos experimentales, postransferencia, con el objetivo de intentar aumentar los porcentajes de gestación de las receptoras aumentando los niveles de P₄ en sangre, mediante dispositivos intravaginales de P₄ o mediante la administración de 100µ de GnRH (Fertagyl[®]) para la formación de CL accesorios y la disminución de los niveles de 17-β Estradiol (E₂) en el período crítico de gestación, ya que niveles altos de E₂ pueden inducir la liberación de PGF_{2α} por el endometrio (Schrick *et al.*, 1999; Binelli *et al.*, 2001); también se ha experimentado con la administración de 500 mg de flunixin meglumine (Finadyne[®]), con objeto de minimizar la producción de prostaglandinas por el endometrio debido a la manipulación del tracto genital durante la transferencia del embrión (Schrick *et al.*, 2000).

De este modo y atendiendo a estos planteamientos en la presente Tesis Doctoral, abordamos los siguientes

OBJETIVOS

1. Evaluar los porcentajes de gestación de las hembras receptoras, según los diferentes protocolos de sincronización utilizados, el tipo y el estado de desarrollo del embrión transferido y la calidad de su CL.
2. Evaluar los porcentajes de gestación obtenidos en las receptoras a las que se han aplicado tratamientos de postransferencia como estrategia para mejorar su fertilidad.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.- Introducción

En los últimos años la biotecnología, aplicación de principios científicos biológicos con fines industriales (Görlach, 1999) ha progresado considerablemente, sobre todo en el área de la reproducción y la genética molecular y se ha convertido en una importante herramienta que permite aumentar la eficiencia reproductiva de los animales (Palma, 2001).

Entre las biotecnologías reproductivas, la inseminación artificial (IA), la superovulación y el trasplante de embriones, han tenido un impacto notable en los programas de mejora genética del ganado bovino (Bó and Mapletoft, 2003; Thibier, 2006).

El TE se realiza desde hace más de treinta años (Merton *et al.*, 2003) y hoy en día, es una técnica muy utilizada en todo el mundo (Cutini *et al.*, 2000; Duica, *et al.*, 2007). El éxito de un programa de TE, se mide por el número de descendientes que nacen vivos por hembra donante en un determinado espacio de tiempo (Peres *et al.*, 2006). Los resultados se ven afectados por una serie de factores inherentes a la donante, al embrión, a la aplicación de la técnica y a las receptoras, que reciben un embrión extraño a nivel uterino permitiendo su desarrollo gestacional (Duica *et al.*, 2007; Peres *et al.*, 2006).

La producción mundial de embriones, en 2013, según las estadísticas de la Sociedad Internacional de Trasplante de Embriones, fue de 729.246 embriones producidos *in vivo*, siendo Norte América con un 53,83% la región donde más embriones se produjeron; mientras que *in vitro*, se produjeron por OPU, 517.587, siendo Sudamérica la región con más actividad y Brasil con un 59,73%, el país que más actividad *in vitro* tiene; la producción de embriones *in vitro* a partir de ovarios de matadero fue de 29.041 embriones; la producción total fue de 1.275.874 embriones. Con embriones *in vivo*, se transfirieron 575.785 embriones de los cuales, el 59,8% fueron embriones congelados; con embriones *in vitro* se transfirieron 411.198 de los cuales el 89,8% fueron transferencias en fresco; (Tablas 1, 2 y 3). Un aspecto importante es que de los 225 países con actividad en TE, solo 40 (17,78%), aportan datos para las estadísticas de la IETS, por lo que es lógico pensar, que la producción mundial de embriones es superior a la aquí mencionada. (IETS 2014).

Tabla 1: Producción y transferencia de embriones *in vivo* en el mundo en 2013 (IETS 2014)

Region	In-vivo embryo collection				In-vivo embryo transfers			
	Collections	Transferrable embryos	No. embryos per collection	% of global embryo prod'n	No. fresh embryos	No. frozen embryos	Total transferred	% Global transferred
Africa	1081	8461	7.83	1.16%	4098	2754	6852	1.15%
Asia	9391	105249	11.21	14.43%	27346	62844	90190	15.71%
Europe	22316	135711	6.08	18.61%	46206	73662	119868	20.89%
North America	57735	392530	6.80	53.83%	115832	161785	277617	48.31%
Oceania	2837	14525	5.12	1.99%	5488	8570	14058	2.23%
South America	12545	72770	5.80	9.98%	32666	34534	67200	11.71%
GRAND TOTAL	105905	729246	6.89	100.00%	231636	344149	575785	100.00%



Tabla 2: Producción y transferencia de embriones *in vitro* en el mundo en 2013 (IETS 2014).

Region	Ovum pick up					Abattoir				
	Collection			Transfers		Collection			Transfers	
	Donors	Oocytes	Embryos	Fresh embryo	Frozen embryo	Donors	Oocytes	Embryos	Fresh embryo	Frozen embryo
Africa	1384	20097	5012	3048	1552	0	0	0	53	10
Asia	1827	30441	4171	0	0	1832	751749	25896	8571	6422
Europe	7506	60315	13722	9236	2804	1449	19881	1050	45	29
North America	24707	444312	112300	53836	12766	355	7403	2093	2076	355
Oceania	2730	27114	5923	2417	3038	2	52	2	9	3
South America	47684	949330	376459	289903	15025	0	0	0	0	0
Global	85838	1531609	517587	358440	35185	3638	779085	29041	10754	6819

Tabla 3: Porcentaje de transferencias de embriones *in vivo* congelados e *in vitro* en fresco en las distintas regiones, en 2013, que aportan datos a la IETS (IETS 2014).

Región	% de transferencias con embriones <i>in vivo</i> congelados	% de transferencias en fresco con embriones <i>in vitro</i>
África	40,2%	66,5%
Asia	69,7%	57,2%
Europa	61,5%	76,6%
América del Norte	58,3%	81%
Oceanía	61%	44,4%
América del sur	51,4%	95,1%
TOTAL	59,8%	89,8%

Esta biotecnología ha demostrado que consigue acelerar el progreso genético, reduce el riesgo de transmisión de enfermedades e incrementa el número de animales que pueden criarse a partir de un progenitor superior.

Para llevar a cabo con éxito esta técnica reproductiva, se hace indispensable, antes de tener en cuenta el procedimiento en sí y todos los factores que afectan a la eficiencia del trasplante de embriones, comprender como es la endocrinología y fisiología reproductiva de la vaca, ya que nos va a proporcionar una mayor capacidad para alcanzar su control (Colazo and Mapletoft, 2014b).

II.2.- Fisiología y Endocrinología de la reproducción en la hembra bovina

El ciclo estral de la hembra bovina está regulado por una delicada interacción entre las hormonas sintetizadas y secretadas por el hipotálamo: hormona liberadora de gonadotropinas (**GnRH**); la hipófisis: hormona folículo estimulante y hormona luteinizante; los ovarios: progesterona, 17β-Estradiol e inhibina y el útero: prostaglandina F_{2α}; constituyendo lo que se conoce comúnmente como eje-hipotalámico-gonadal-uterino (ver esquema de actuación en Figura 1)

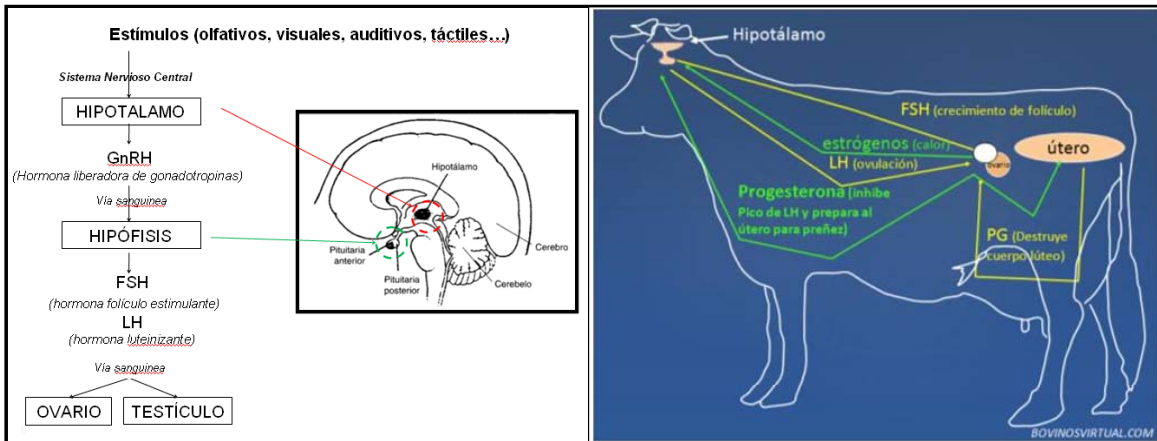


Figura 1: Esquema simplificado de las interrelaciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero.

Este control es ejercido a través de un sistema de regulación mediante el cual una hormona o producto de secreción, puede inhibir la liberación de otra hormona (retroalimentación negativa) o por el contrario, estimular la síntesis y liberación de una mayor cantidad de hormona (retroalimentación positiva) (Stevenson, 2007). Por ello, es conveniente que, antes de explicar las fases en que se divide el ciclo estral, pasemos a enumerar cuales son las glándulas, hormonas y mecanismos más importantes que van a regular este proceso (Figura 2).

- ↪ Los estímulos procedentes del medio ambiente (olfativos, visuales, auditivos y táctiles), son recogidos por el sistema nervioso central y transmitidos al hipotálamo.
- ↪ Las neuronas endocrinas del hipotálamo, elaboran GnRH que vía sanguínea, llega a la hipófisis.
- ↪ La hipófisis elabora dos hormonas, la FSH y LH, que vía sanguínea, llegan a los ovarios.

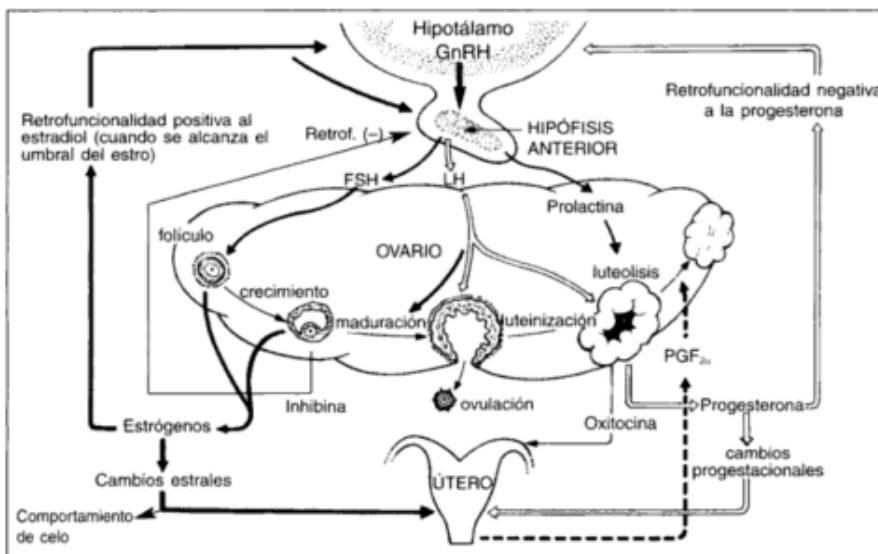


Figura 2: Mecanismo de acción de las principales hormonas reproductivas sobre los ovarios y útero de las hembras bovinas.



Las neuronas del hipotálamo (localizado en la base del cerebro), producen la hormona liberadora de las gonadotropinas o GnRH, hormona peptídica (decapéptido), que ejerce su acción biológica a nivel hipofisario, estimulando la secreción de LH y FSH.

La GnRH es secretada de dos formas: una secreción pulsátil o tónica, desde el centro tónico del hipotálamo y la secreción preovulatoria de GnRH, que anteriormente se creía que era directamente estimulada por el E₂ (Colazo y Mapletoft, 2014b). Las neuronas que secretan GnRH no tienen receptores para el E₂, pero sí para un péptido denominado Kisspeptina, que es un potente estimulador de la secreción de GnRH, por lo que se cree, que en función de las concentraciones sanguíneas de las hormonas esteroideas, la Kisspeptina traslada la información a las neuronas secretoras de GnRH (Gottsch *et al.*, 2004).

La GnRH llega a la hipófisis (formada por una parte anterior o adenohipófisis y una posterior o neurohipófisis), a través del sistema porta-hipotálamo-hipofisario (Moenter *et al.*, 1992) y controla la liberación de la LH y la FSH.

Como su nombre indica, la FSH estimula el desarrollo de los folículos primordiales existentes y el desarrollo de éstos, hasta la fase de folículos terciarios.

La LH tiene una doble acción estimulante, por un lado, sobre la maduración de los folículos hasta provocar la ovulación y subsiguientemente el desarrollo del cuerpo lúteo; por otro, sobre la secreción de estrógenos por el epitelio folicular, responsables de la aparición de los síntomas del celo y de que el útero entre en fase de proliferación.

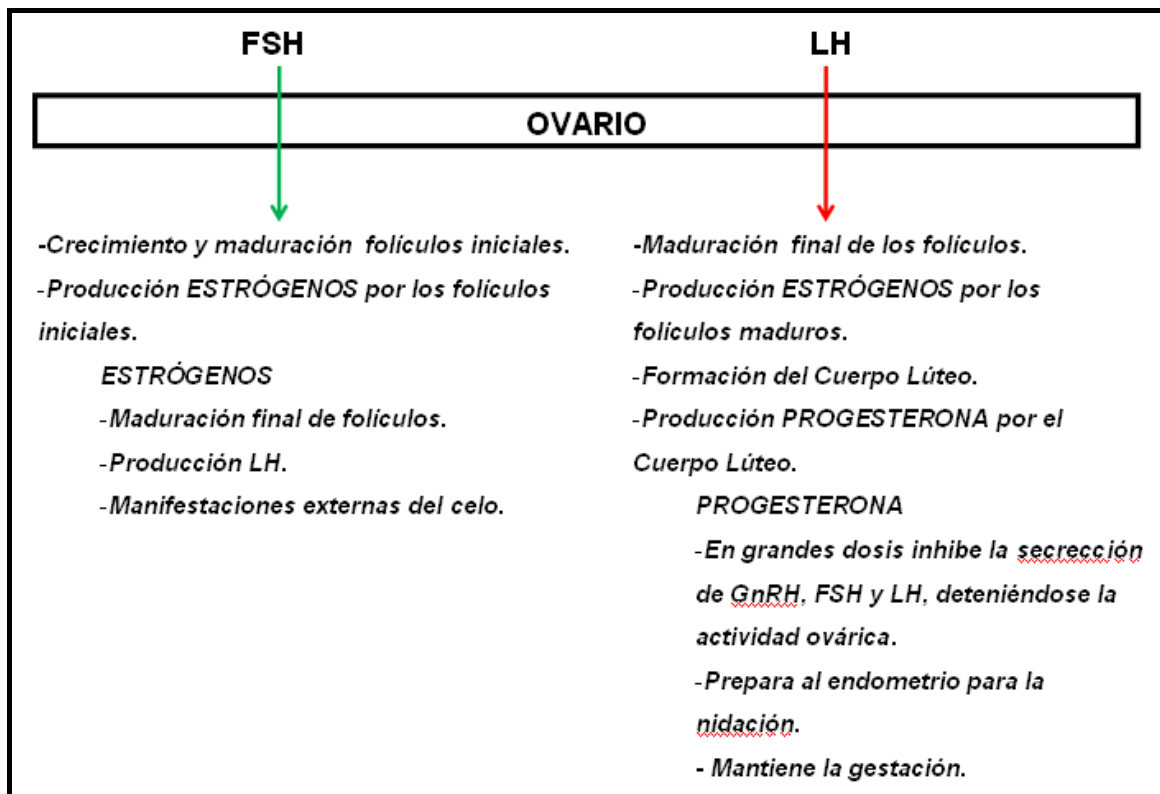


Figura 3: Principales acciones de las hormonas gonadotropinas (LH y FSH) sobre las gónadas de la hembra bovina.



Durante el período de maduración de los folículos hasta la ovulación, ambas hormonas actúan de forma sinérgica y con ellas lo hacen también los factores de crecimiento con actividad insulínica (**IGF-I**), que aumentan el número y la actividad de los receptores foliculares a las gonadotropinas y optimizan la respuesta de las células de la granulosa y la teca a la FSH y la LH (Lucy, 2000). La secreción de ambas gonadotropinas, depende de un complejo mecanismo hipotalámico-hipofisario que obedece a un efecto de retroalimentación de las hormonas gonadales (Findlay y Clarke, 1987; Fieni *et al.*, 1995).

Estas hormonas, LH y FSH, son secretadas a la circulación en forma de pulsos y son reguladas por dos sistemas: el tónico y el cíclico.

El sistema tónico, produce el nivel basal circulante, siempre presente, de hormonas hipofisarias las cuales promueven el desarrollo de los elementos germinales y endocrinos de las gónadas

El sistema cíclico, opera más agudamente, siendo evidente por solo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de la hembra. El modo cíclico tiene por función primaria, causar la ovulación.

En los ovarios se producen los ovocitos, al actuar como glándula exócrina, y hormonas, principalmente estrógenos, progesterona e inhibina, al actuar como glándula endocrina.

Entre los estrógenos destaca el E₂, que es el más importante y activo de ellos. Su síntesis tiene lugar en el epitelio folicular, particularmente durante la fase terminal del proceso de crecimiento de los folículos en cada ciclo estral. Se vierte al torrente sanguíneo en respuesta al efecto estimulante de la LH, cuya creciente secreción pulsátil es trasladada a la del E₂ hasta alcanzarse la más alta concentración justo antes de la ovulación (Langford *et al.*, 1980; Wolfenson *et al.*, 2004). El 17-β-Estradiol, lleva a cabo las siguientes acciones:

- Retroalimenta positivamente la secreción de FSH y LH durante el crecimiento y desarrollo folicular, acción que se consume con la aparición del pico preovulatorio de LH, necesario para la maduración y dehiscencia folicular, esto es, la ovulación.
- desencadena la aparición de los síntomas del celo, lo que equivale a decir que gobierna el comportamiento sexual de las hembras.
- Modifica la actividad secretora de las células uterinas con el fin de facilitar, por un lado, el desplazamiento de los espermatozoides y por otro, sensibilizarlas al efecto estimulante de la progesterona.
- Interviene en la síntesis y liberación de la PGF_{2α} por el útero.
- Colabora en el desarrollo final de la glándula mamaria al término de la gestación.



- Retroalimenta negativamente la secreción de gonadotropinas fuera del ciclo estral.

Con respecto a la progesterona, las células de la granulosa que permanecen en el folículo ovárico después de la ovulación, originan bajo el efecto estimulante de la LH el CL, lugar de formación de la P_4 , secretada a un ritmo creciente hasta alcanzar la cota más alta que persiste entre los días 8 y 17 aproximadamente del ciclo estral, poniendo freno al crecimiento de nuevos folículos. La P_4 ejerce una serie de acciones importantes, antes y después de la nidación, entre las que cabe destacar:

- Su intervención en el acondicionamiento del endometrio uterino con vistas a la implantación embrionaria y en el afianzamiento de los mecanismos reguladores de la nutrición y supervivencia de los embriones, de ahí que se la conozca como la hormona protectora de la gestación.
- Concentraciones altas de P_4 , se asocian a un mayor crecimiento del embrión y una mayor producción de interferón tau ($IFN-\tau$) que puede favorecer el reconocimiento maternal de la gestación, (Carter *et al.*, 2008; Clemente *et al.*, 2009; O'Hara *et al.*, 2012).
- Acción de cierre del canal del cérvix para impedir la penetración de nuevos espermatozoides, al tiempo que confiere una mayor viscosidad a la mucosidad de esa misma sección del tracto genital, con la misma finalidad preventiva.
- Inhibe la producción de receptores de la oxitocina en el miometrio, lo que equivale a decir que ejerce una acción inhibitoria de la actividad de esta hormona impidiendo la aparición de contracciones uterinas en el transcurso de la gestación.
- Colabora con otras hormonas en el inicio y mantenimiento de la función de la lactación.
- Su presencia como requisito previo para la aparición de los síntomas del celo, pues si bien es cierto que a los estrógenos se debe dicha sintomatología, para desencadenarla deben haber sido reconocidos anteriormente por el hipotálamo, gracias a receptores específicos cuyo número y actividad aumentan por efecto de la P_4 .

La inhibina, hormona proteica, es producida por el folículo ovárico (granulosa) e interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH. Ejerce un efecto de retroalimentación negativa a nivel hipofisario, provocando una menor secreción de FSH.

Por último, en el útero en caso de no producirse la fecundación, se libera la $PGF_{2\alpha}$, la cual interviene en la regulación neuroendocrina del ciclo estral mediante su efecto luteolítico sobre el CL, siendo la responsable directa de la luteolisis y de la finalización por tanto de la secreción de P_4 , posibilitando con ello, el inicio de un nuevo ciclo estral



Sin la regresión del CL, en caso de no producirse la fecundación, no es posible iniciar un nuevo ciclo estral; la regresión del CL exige la intervención de un factor luteolítico, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ es la encargada de cumplir este cometido una vez sintetizada y secretada por el endometrio en respuesta a los pulsos crecientes de E_2 provenientes del ovario; del endometrio pasa a la vena uterina y de ésta, a la arteria ovárica para ejercer ya su efecto localmente (Weems *et al.*, 2006). El mecanismo exacto de la luteolisis hoy en día, todavía no está completamente dilucidado.

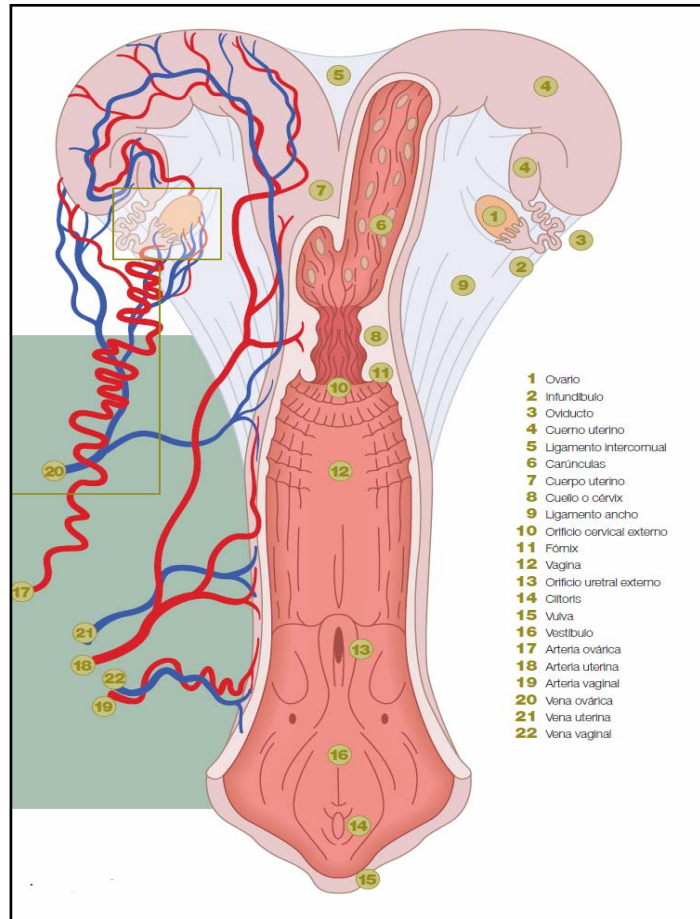


Figura 4: Mecanismo de transporte de la prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ en el tracto genital de la vaca (Dyce *et al.*, 1999).

II.3.- Ciclo estral

Se define como el periodo de tiempo comprendido entre la aparición del estro y el comienzo del siguiente estro, o el intervalo de tiempo entre dos ovulaciones.

El ciclo estral representa un patrón cíclico de actividad ovárica que permite a las hembras bovinas ir de un periodo reproductivo de no receptividad, a uno de receptividad, permitiendo establecer el apareamiento y el subsecuente establecimiento de la gestación (Forde *et al.*, 2011a).

El inicio del ciclo estral ocurre al momento de la pubertad, en donde la hembra bovina entra en un periodo de ciclicidad reproductiva que continua a través de toda su vida, a excepción del periodo de gestación o de balance energético negativo, en el cual prevalece el anestro (Sartori and Barros, 2011).

La vaca es un animal poliéstrico continuo y cada ciclo dura entre 17 y 25 días, considerándose 21 días como el tiempo promedio, siendo un poco más corto en novillas.

En el ciclo estral se pueden distinguir las siguientes fases:

1.- Fase folicular o estrogénica: 1/3 del ciclo estral.

- Proestro.
- Estro.



2.- Fase luteal: 2/3 del ciclo estral.

- Metaestro.
- Diestro.

El día 0 del ciclo estral es el día del celo, sin embargo, desde el punto de vista fisiológico, la descripción se realizará a partir de la destrucción del cuerpo lúteo y finalizará en la destrucción del cuerpo lúteo del próximo ciclo.

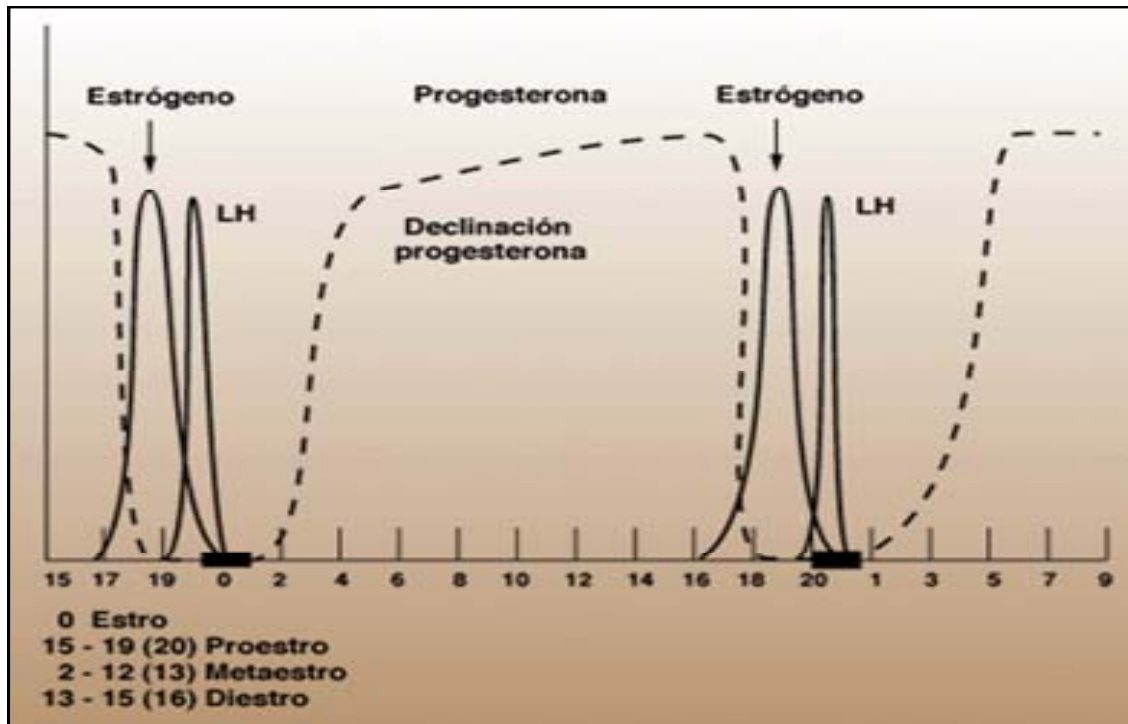


Figura 5: Evolución hormonal en el ciclo estral de la vaca (UCCL, 2012).

II.3.1.- Fase folicular o estrogénica

Dentro de esta fase nos encontramos con dos periodos, el proestro y el estro.

- El proestro, cuya duración es de aproximadamente 3 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con las manifestaciones del celo. Al producirse la destrucción del CL, tenemos una caída en los niveles de P_4 circulante y posteriormente, una pérdida de tejido luteal, siendo la $PGF_{2\alpha}$ (de origen uterino), el principal factor luteolítico. Como consecuencia de la caída de los niveles de progesterona, disminuye la retroalimentación negativa que dicha hormona ejercía a nivel hipotalámico y comienza a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotrópicas, FSH y LH, estimulándose el crecimiento folicular con el desarrollo de un gran folículo y el aumento en los niveles de E_2 . Cuando los estrógenos alcanzan cierto nivel, se estimula la receptividad al macho y comienza el período de celo o estro, donde las hembras son sexualmente receptivas y permiten ser montadas (Stevenson, 2007).
- La fase de estro, involucra todos los cambios que permiten la ovulación y comienzo de la formación del cuerpo lúteo. Durante el estro, (cuya duración es de 18 ± 6 horas), la vaca manifiesta inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y



pierde el apetito; las vacas presentan descarga de mucus con mínima viscosidad (filante), edema de vulva y en el útero, se produce un aumento del tono miométrial, detectado fácilmente por palpación transrectal.



Foto 1: Imágenes de vacas de producción láctea en celo.

Durante esta fase, los estrógenos en altas concentraciones alcanzan el umbral de estimulación del centro cíclico hipotalámico, estimulando a las neuronas hipotalámicas a producir el pico de GnRH y en consecuencia el pico preovulatorio de LH.

Con respecto a la FSH, disminuye su secreción, (consecuencia de la retroalimentación negativa de los estrógenos y de la inhibina), con excepción del momento en que se produce el pico preovulatorio de LH, y un pico de FSH. Posteriormente, 4 a 12 horas después de la onda de LH, se incrementan la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH, relacionándose esto con la primera onda de crecimiento folicular.

Después de 12 a 24 horas de comenzado el celo, el sistema nervioso de la vaca se torna refractario al estradiol y cesan todas las manifestaciones psíquicas del mismo.

II.3.2.- Fase luteal

Esta fase comprende el metaestro y el diestro.

- El metaestro es el período inmediato a la finalización del celo, (6 días). En este período ocurre la ovulación de la vaca (a diferencia de las otras especies, que lo hacen durante el celo), y comienza la organización celular y desarrollo del cuerpo lúteo. La ovulación ocurre 28 a 32 horas de iniciado el celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH. A la ovulación, le sigue una hemorragia profunda y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en cuerpo hemorrágico. En la formación del cuerpo lúteo (luteinización), se producen una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que permiten que las células foliculares se transformen en células luteales, cambios que finalizan al séptimo día con un cuerpo lúteo funcional.

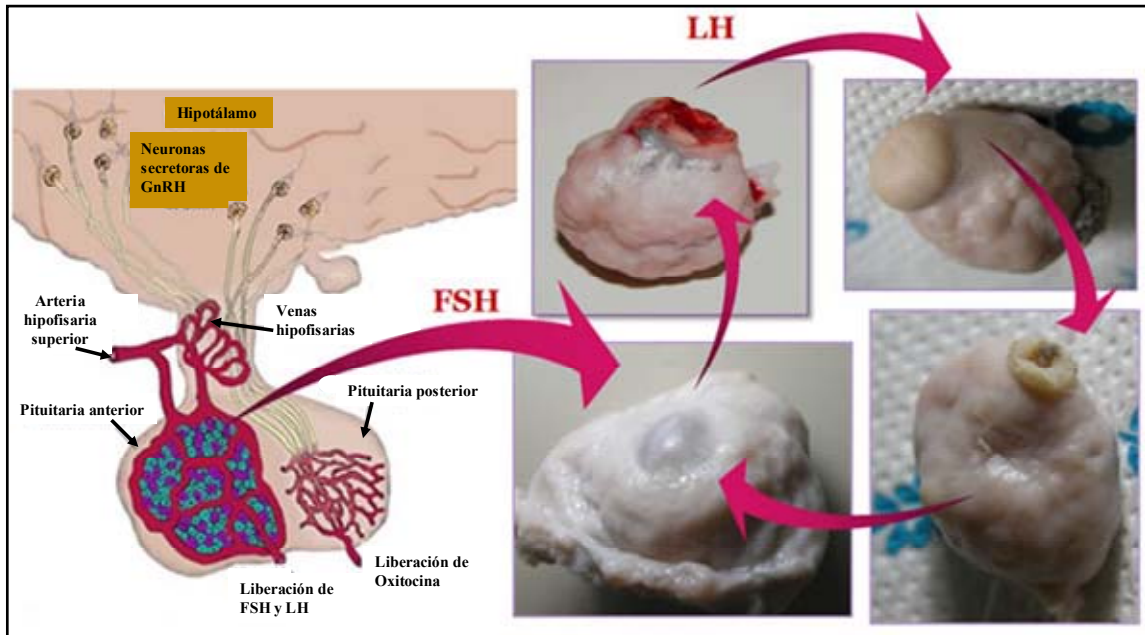


Figura 6: Estructuras ováricas de la hembra bovina a lo largo de las distintas etapas de su ciclo estral.

- El diestro, continuación del metaestro, se caracteriza por el dominio del cuerpo lúteo, el mantenimiento del cuerpo lúteo, así como la síntesis de progesterona que está ligada a la hormona LH (que es progesterotrófica y luteotrófica). La concentración de P₄ en sangre comienza a aumentar debido a la formación del CL en el que las células luteinizadas de la granulosa y la teca, producen grandes cantidades de P₄ en preparación para el establecimiento y mantenimiento de la preñez o la reanudación del ciclo estral (Niswender *et al.*, 2000).

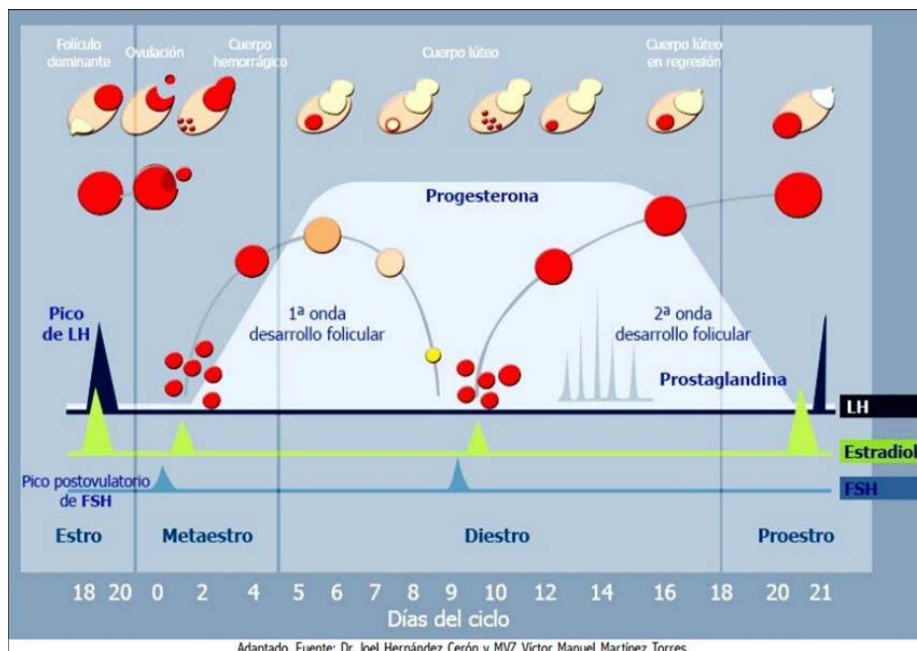


Figura 7: Representación de los niveles de las distintas hormonas y estructuras ováricas a lo largo de las fases del ciclo estral en las vacas.



II.4.- Dinámica Folicular

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio. Rajakoski (1960), basado en estudios histológicos de ovarios, propuso la hipótesis de ocurrencia de dos ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. Posteriormente, con el uso de la ultrasonografía como método efectivo para realizar el seguimiento y evaluación de la actividad folicular ovárica, diversos investigadores confirmaron la presencia de estas ondas de crecimiento (Pierson and Ginther, 1984) y patrones de desarrollo de folículos antrales en la hembra bovina (Buratini *et al.*, 2000; Ginther *et al.*, 2001).

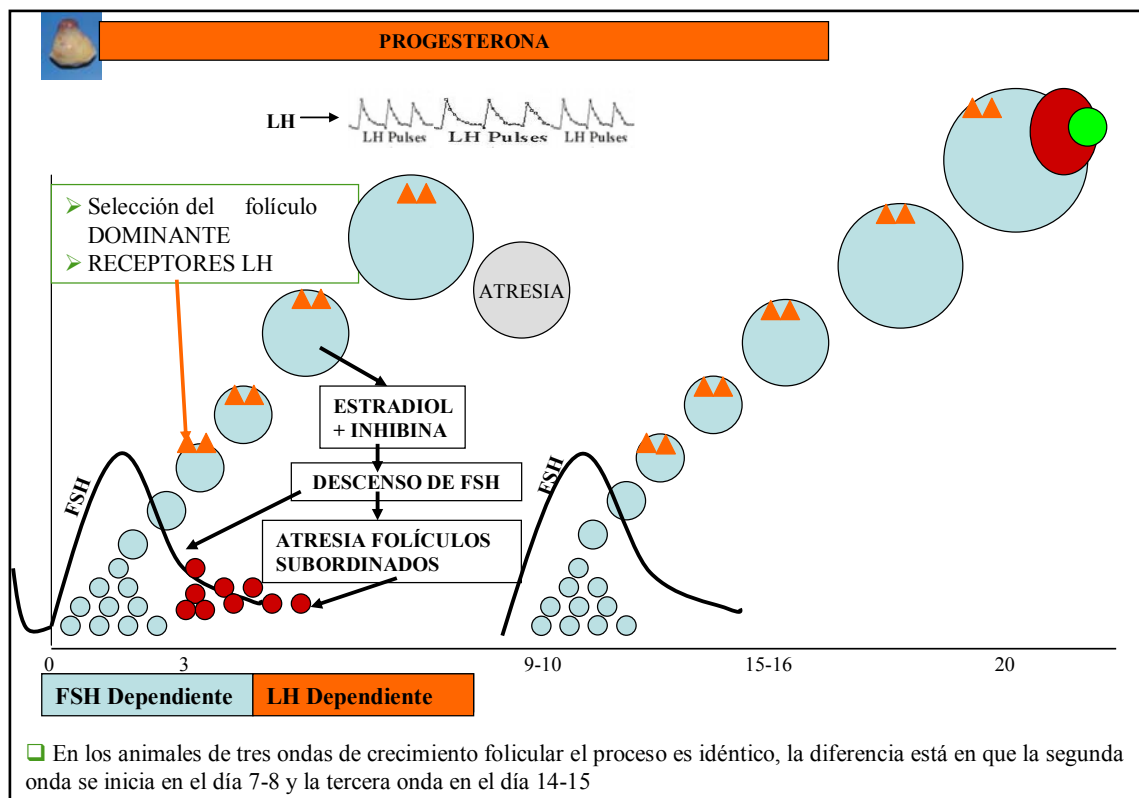


Figura 8: Dinámica folicular : dos ondas de crecimiento folicular.

Se conoce a la onda folicular como la activación y crecimiento simultáneo de un grupo de folículos terciarios que en un punto divergen, continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación, folículo dominante (**FD**), mientras que el resto de los folículos, folículos subordinados (**FS**), se atresian.

Una onda de desarrollo folicular está funcionando a través de procesos integrados de reclutamiento, selección y dominancia folicular. El reclutamiento y emergencia de una onda folicular es un proceso que ocurre inmediatamente después del celo, en el que, un número indeterminado de folículos antrales tempranos de 3-4 mm de diámetro (Ginther *et al.*, 1989a), con receptores de FSH en las células de la granulosa y receptores LH en las células de la teca interna, comienzan a crecer con altas concentraciones de FSH. A los 2-3 días, un folículo se selecciona como dominante y provocará la atresia de los folículos subordinados; el aumento de la cantidad de estrógenos producidos por el dominante y los subordinados y la producción de inhibina por el dominante, provocan un descenso importante en la producción de FSH. El folículo dominante, sigue



creciendo gracias a la LH ya que adquiere receptores LH en las células de la granulosa, mientras que los subordinados, no adquieren estos receptores LH y son incapaces de seguir creciendo con poca cantidad de FSH. El folículo dominante degenerará con altos niveles de progesterona producidos por el CL que provocan una disminución en la frecuencia de los pulsos de LH, induciendo el cese de las funciones metabólicas del FD; como consecuencia, se iniciará una nueva onda de crecimiento folicular.

Se puede afirmar, que en cada onda de crecimiento folicular existen dos fases, una FSH dependiente y otra LH dependiente, en la que se produce la atresia de los FS y el FD se sigue desarrollando gracias a la LH; en presencia de un CL el FD evoluciona hacia la atresia, ya que la progesterona secretada por el CL disminuye la frecuencia de los pulsos de LH, y por tanto la concentración de LH no es suficiente para estimular la maduración final y la ovulación (Roche and Boland, 1991; Savio *et al.*, 1993), produciéndose el cese de sus funciones metabólicas y la atresia, que provocará la emergencia de una nueva onda de crecimiento folicular, que una vez más, es precedida por un aumento transitorio de FSH (Ginther *et al.*, 1989a). Si se produce la luteolisis, la disminución de la concentración sanguínea de LH, provoca un aumento en la frecuencia de los pulsos de LH, estimulando un mayor crecimiento del FD, aumento de E_2 , un pico de FSH (que ocurre al mismo tiempo que el pico preovulatorio de LH), seguido de la ovulación y un nuevo pico de FSH, que será el responsable de la emergencia de la nueva onda folicular del siguiente ciclo (Figura 9)

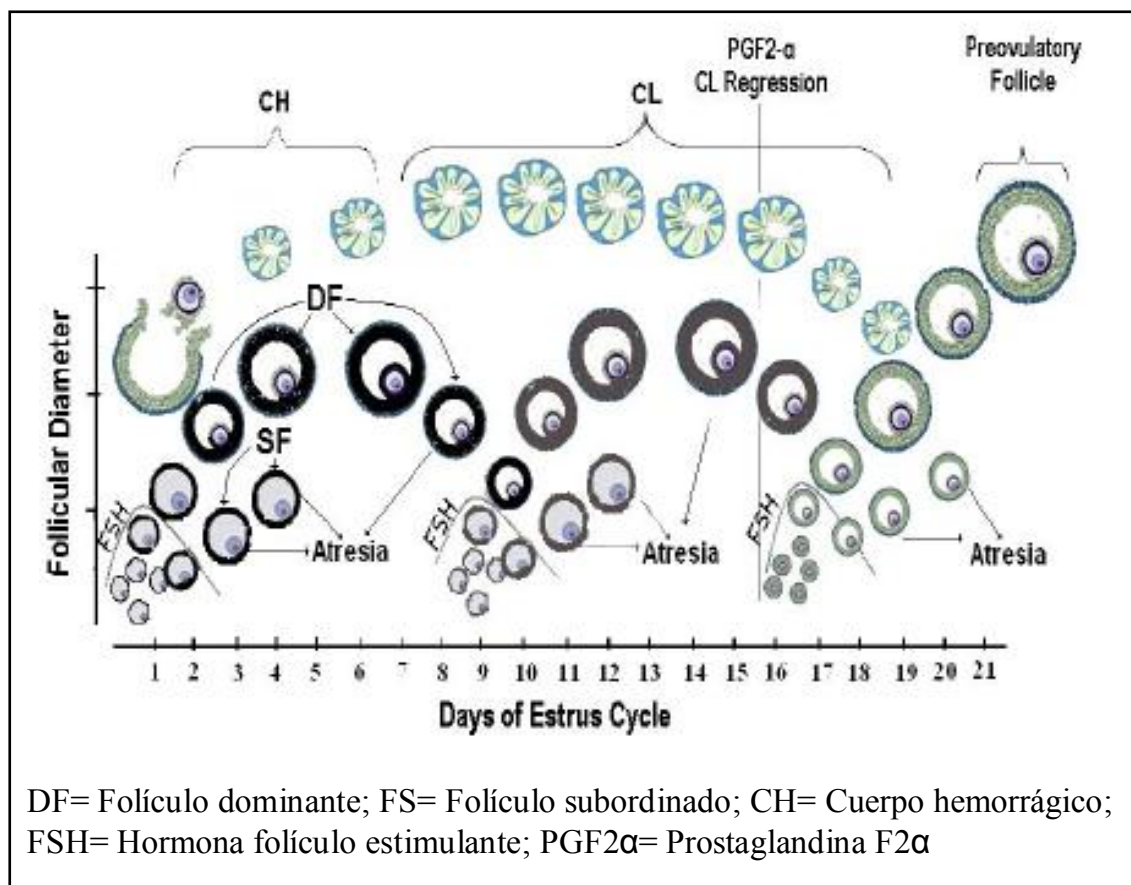


Figura 9: Modelo esquemático de tres ondas de crecimiento folicular y desarrollo del cuerpo lúteo en bovinos.



Si analizamos el momento en el que ocurren las ondas de desarrollo folicular dentro del ciclo estral de una hembra bovina, podemos afirmar que según los autores consultados, este momento dependerá del patrón de número de ondas de su ciclo estral; debemos tener en cuenta que si bien se ha descrito que en el 95% de los ciclos estrales en las vacas hay dos o tres ondas de desarrollo folicular, hay diferencias entre los estudios en cuanto a la preponderancia de animales con dos o tres ondas y así, algunos investigadores han observado una preponderancia de ciclos estrales de dos ondas (Ginther *et al.*, 1989a), mientras otros, indican una preeminencia de ciclos de tres ondas (Sirois and Fortune, 1988; Bó *et al.*, 1993) y otros han observado una distribución igual (Adams and Pierson, 1995).

En un patrón de dos ondas, la primera onda comienza de promedio, el día 0 (día de la ovulación) y la segunda onda, comienza en el día 10 (Ginther *et al.*, 1989a).

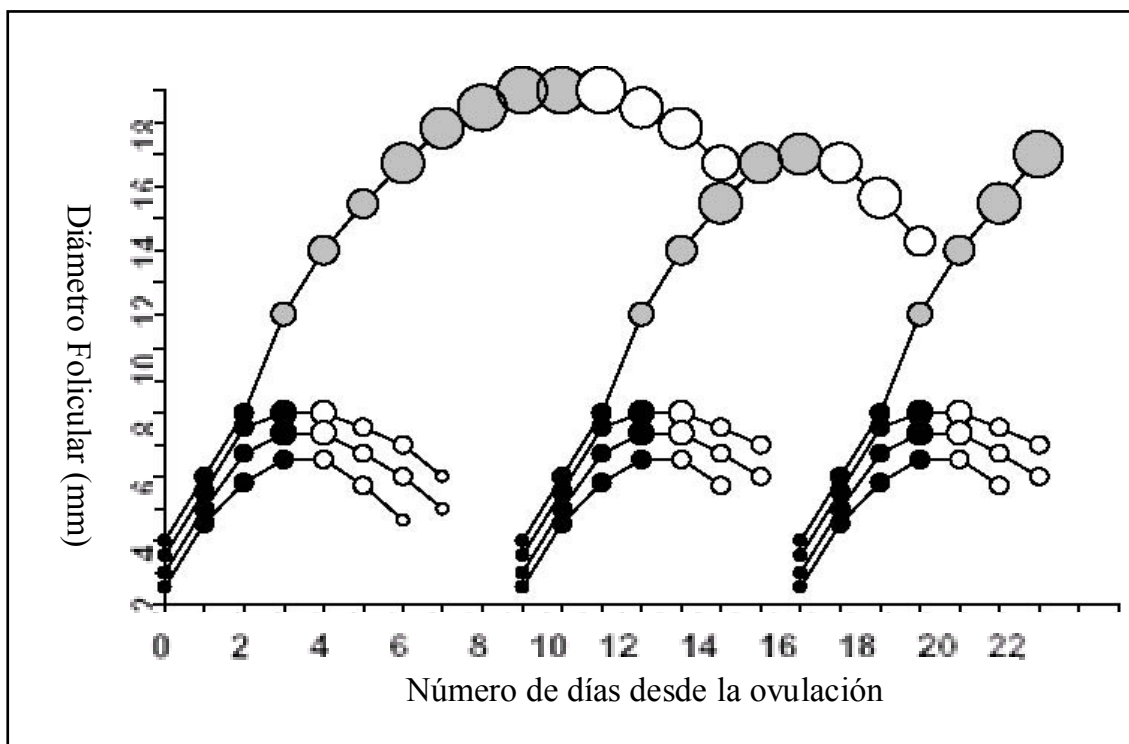


Figura 10: Patrón de tres ondas de crecimiento de los folículos ováricos (Paul and Randy, 2008).

Para el patrón de tres ondas (Figura 10), la emergencia de las ondas ocurren de promedio los días: 0, 9 y 16; las dos primeras, son anovulatorias. Las características del folículo dominante de la primera onda, entre el patrón de dos ondas y el patrón de tres ondas, no es diferente, pero la segunda onda, emerge 1 ó 2 días más temprano en los animales con dos ondas que en los de tres ondas. Además, hay que tener en cuenta que existe una gran variabilidad individual en cuanto al día de emergencia de cada onda, especialmente en la segunda onda, que puede comenzar entre los días 6 a 12 (Ginther *et al.*, 1989a; Bó *et al.*, 1993; Adams and Pierson, 1995; Ginther *et al.*, 1996). También encontramos diferencias en el momento en el que comienza la regresión del cuerpo lúteo, más temprano en los ciclos de dos ondas (día 16), que en los de tres ondas (día 19), afectando al correspondiente intervalo interovulatorio (20 días y 23 días respectivamente, (Ginther *et al.*, 1989a), y en este sentido, el ciclo de 21 días histórico podemos afirmar que no existe, sino que es producto de los promedios entre los ciclos de 2 y 3 ondas (Adams *et al.*, 2008). A su vez, se encontró que animales *Bos indicus*



pueden tener ciclos con 4 ondas de desarrollo folicular (Bo *et al.*, 1993; Figueriedo *et al.*, 1997).

Si bien los factores que afectan el desarrollo folicular no han sido enteramente dilucidados, aparentemente no hay diferencias de fertilidad entre las vacas de dos y tres ondas, sin embargo, factores como el nivel nutricional, estrés calórico, especie, edad o anestro lactacional, pueden modificar el patrón de desarrollo folicular (Murphy *et al.*, 1990; Savio, *et al.*, 1990; Adams and Pierson, 1995). En este sentido, Murphy *et al.* (1990), señala que un nivel nutricional bajo, está asociado a una proporción más alta de ciclos de tres ondas.

II.5.- Reconocimiento maternal de la gestación

El establecimiento de la gestación se produce como resultado de la interacción entre un embrión competente y un ambiente uterino receptivo (Lonergan and Evans, 2015).

Debemos señalar, que hasta la etapa de blastocisto, el embrión es en cierto modo autónomo, es decir, no necesita estar en contacto con el tracto reproductivo de la madre, como lo demuestra el hecho de que los blastocistos pueden ser obtenidos de donantes superovuladas y ser transferidos a receptoras sincronizadas no preñadas. Esto viene a confirmar que el tracto reproductivo no necesita exponerse al embrión antes del día 7 de su desarrollo para que se establezca la gestación (Lonergan and Evans, 2015), e incluso hasta el día 16, tal como apuntaron Betteridge *et al.* (1980). En este sentido, el 9° o 10° día de vida el blastocisto eclosiona e inmediatamente, se establece el primer contacto entre el embrión y el epitelio uterino materno; el embrión comienza a cubrir físicamente parte del endometrio para poder comenzar a regular la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina, la cual cumple funciones de luteólisis (Kaplan, 2002). En este momento, también se desencadena un intercambio de nutrientes que preparará el ambiente para un estado de preimplantación embrionaria (Pereira *et al.*, 2008).

Se puede definir el reconocimiento maternal de la gestación (**RMG**) según Spencer *et al.* (2004a y 2004b), como el periodo crítico en el cual el embrión da señales de su presencia a la madre. Este reconocimiento requiere que el embrión, se transforme de esférico hacia una forma elongada como más tarde veremos, para generar una mayor superficie de contacto con el epitelio uterino, con la finalidad de desencadenar la producción del factor antiluteolítico IFN- τ .

Básicamente el reconocimiento maternal de la gestación está regulado por la capacidad del endometrio para responder a las señales generadas por el embrión, lo que desencadena el bloqueo en la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Este bloqueo, depende principalmente de la elongación del embrión el cual debe cubrir una adecuada cantidad de puntos del cuerno uterino para comenzar a generar la síntesis de IFN- τ (Campanile *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta lo anterior, se ha evidenciado que el embrión bovino varía de tamaño desde 15 a 250 mm (que alcanza en el día 17 de gestación), con lo cual, se resalta la importancia del desarrollo embrionario que es regulado en gran parte, por interacciones guiadas por la P_4 (Binelli *et al.*, 2001).

Es en este periodo de reconocimiento materno de la gestación, que se produce aproximadamente el día 15-17 de preñez en el ganado bovino, cuando se detectan cambios significativos en el perfil del endometrio cíclico frente al gestante (Forde *et al.*,



2011b; Bauersachs *et al.*, 2012), respondiendo al aumento de IFN- τ , secretado por el embrión.

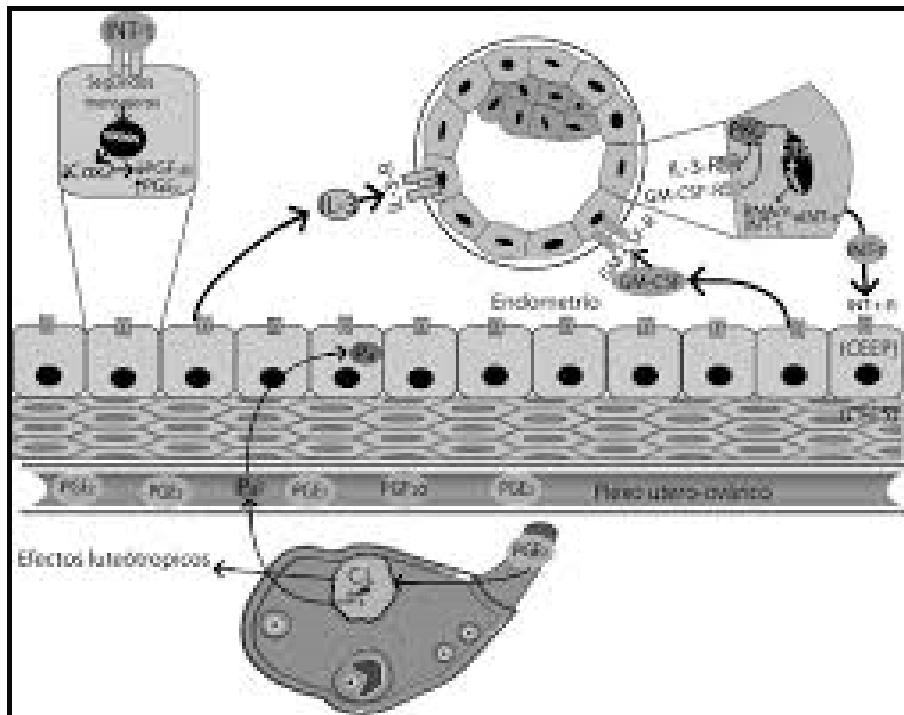


Figura 11: Mecanismo de acción del IFN- τ en contacto con el epitelio uterino.

El IFN- τ se produce en las células mononucleares del trofoblasto embrionario entre los días 10 y 25, con producción máxima alrededor de los días 14 y 19 de gestación (Fleming *et al.*, 2001; Dailey *et al.*, 2002) y ejerce una doble acción, por un lado, prolonga el efecto inhibitorio que ejerce la P_4 sobre la síntesis de receptores de la oxitocina (**OT**) (Geisert *et al.*, 1992), y por otro, contribuye a disminuir la amplitud y los pulsos de $PGF_{2\alpha}$ al estimular la síntesis endometrial de un inhibidor de la prostaglandin-sintetasa (Gross *et al.*, 1988), tal como a continuación explicamos con más detalle.

Durante la fase luteal, la P_4 tiene una doble función en la regulación de la expresión de receptores para la oxitocina en el útero, induciendo la presencia de altos niveles de receptores para P_4 en el endometrio (lo que se denomina, modulación en alta), con lo cual, se inhibe la expresión de los receptores para estrógenos (**RE**) y para oxitocina (**ROT**), fenómeno que se conoce como "bloqueo de la P_4 " (Roberts *et al.*, 1999). No obstante, la misma P_4 comienza a ejercer gradualmente una regulación para la disminución de la expresión de sus propios receptores (modulación baja) en el epitelio luminal, perdiendo así su habilidad para suprimir la expresión endometrial de los receptores de estrógenos y receptores de la oxitocina, por lo cual, en el caso de existir gestación, el embrión debe extender el "bloqueo de la P_4 ", impidiendo la producción pulsátil de $PGF_{2\alpha}$ mediante la secreción del IFN- τ (factor luteotrópico) (Klisch *et al.*, 2009).

Este efecto antiluteolítico del IFN- τ , da lugar al mantenimiento estructural y funcional del CL, por lo que se asegura la secreción de P_4 , que resulta esencial para sostener un ambiente uterino que soporte los acontecimientos críticos para el desarrollo exitoso del embrión (Bilby *et al.*, 2004).



En resumen, el establecimiento de la gestación se produce como resultado de la interacción entre un embrión competente y un ambiente uterino receptivo, donde la P₄ juega un papel importante en los procesos reproductivos relacionados con el establecimiento y el mantenimiento de la gestación a través de su acción sobre el endometrio uterino (Lonergan and Evans, 2015).

II.6.- Técnica del trasplante de embriones *in vivo*

La primera transferencia de un embrión bovino fue realizada en 1949 (Umbaugh, 1949), y el primer ternero de embriones nació en el año 1951 (Willett *et al.*, 1951). La aplicación del trasplante de embriones a la industria ganadera comenzó hace más de treinta años (Merton *et al.*, 2003; Mollo *et al.*, 2007).

Hasta hace algunos años, la colección y transferencia de embriones en bovinos se realizaba de forma quirúrgica, por lo que se hacía muy difícil su aplicación en el campo (Rowson *et al.*, 1969). El desarrollo de nuevos instrumentos, métodos de recolección y la transferencia de los embriones no quirúrgica, abrió la posibilidad de usar el TE como una técnica más en los programas reproductivos, en animales de alto valor genético (Rowe *et al.*, 1976; Eldsen *et al.*, 1976, Rowe *et al.*, 1980).

El TE tiene como principal objetivo la obtención de crías a partir de donantes genéticamente superiores, utilizando el útero de receptoras de menor valor económico para llevar la gestación a término (Bó, 2000). Dentro de las ventajas que presenta, podemos mencionar (Duica *et al.*, 2007):

- Obtención de una descendencia genéticamente superior.
- Disminución del riesgo de contagio de enfermedades infecciosas.
- Mejora genética de un grupo de animales a corto plazo.
- Multiplicación de las características de una hembra genéticamente superior.
- Rescate genético de animales accidentados o enfermos permanentes de los que se pudieran obtener embriones antes de que el animal muera.
- Comercio nacional e internacional de embriones procedentes de animales de alto valor genético.
- Maximiza el uso de material seminal de alto valor genético.
- Permite hacer una planificación de los cruzamientos.

El trasplante de embriones, al utilizar tanto la vía macho como la vía hembra, produce un mayor progreso genético que la IA; con un aumento en la intensidad de selección y acortando el intervalo generacional; la ganancia genética puede ser grande aún dentro del mismo rebaño (Smith, 1988a; Bondoc *et al.*, 1989; Christensen, 1991). Esto ha resultado en lo que se denomina grupo MOET (múltiple ovulación y transferencia de embriones) (Smith, 1988a; Smith, 1988b; Ruane and Smith, 1989). En varios países del mundo, núcleos genéticos están siendo desarrollados y las novillas están siendo superestimuladas (MOET juvenil), produciendo hembras y machos de alto valor genético que serán seleccionados para ser la próxima generación de donantes y sementales que serán usados en IA (Smith and Ruane, 1987; Teepker and Keller, 1989). De esta manera, podría aumentar la intensidad de selección al doble (Smith and Ruane, 1987).



Actualmente, la transferencia de embriones es usada para producir futuros sementales, hijos de las mejores vacas y toros disponibles, para los programas de testaje en descendencia de los centros de IA y para producir hembras de alto valor genético, con el objetivo de mejorar la rentabilidad de la ganadería desde la genética.

En España, la actividad en trasplante de embriones en los últimos 20 años ha sido importante, (debido fundamentalmente a la necesidad de los centros de inseminación artificial de obtener sementales de alto valor genético), por lo que se crearon equipos de TE, para implantar los embriones que se importaban y superovular a las mejores vacas nacionales. En el período 1999-2009 se han venido realizando una media de 477 superovulaciones por año, lo que supone una producción media de embriones (obtenidos mediante la técnica no quirúrgica), de 2.300 al año aproximadamente (de la Fuente *et al.*, 2012)

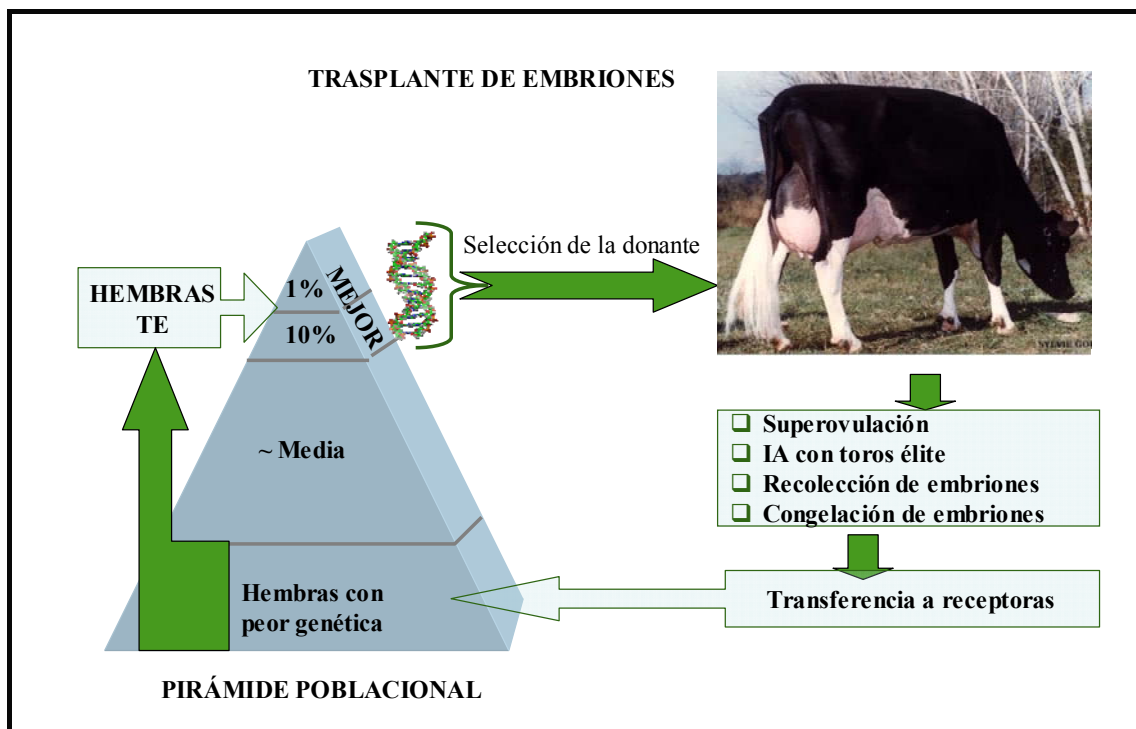


Figura 12: Principales etapas de la transferencia embrionaria en ganado vacuno.

Desde el punto de vista metodológico, la técnica de la transferencia de embriones es sencilla en su concepto, pero compleja en cuanto a su realización, debido principalmente al gran número de factores que inciden sobre ella y a la necesidad de una serie de pasos precisos y consecutivos, de cada uno de los cuales dependerá el éxito o fracaso de la técnica, los principales son (Figura 12):

- 1.- Selección de donantes:
 - 1.1. Criterios genéticos de selección.
 - 1.2. Criterios no genéticos de selección.
- 2.- Superovulación de donantes.
- 3.- Recolección de embriones.
- 4.- Búsqueda y valoración de los embriones.
 - 4.1.- Valoración morfológica de los embriones por su estado de desarrollo.
 - 4.2.- Clasificación de los embriones según su calidad.
5. Conservación de embriones.
- 6.- Selección de receptoras.
 - 6.1. Características de las receptoras.



- 62. Sincronización de receptoras.
- 6.3. Transferencia.

II.6.1.- Selección de donantes

Aún no existe la vaca donante que sirva para cumplimentar todas las exigencias requeridas por un ganadero o bien para adaptarse a la situación del mercado en cada momento, por lo que hay que tener en cuenta unos criterios generales que se puedan utilizar para incrementar el nivel genético medio del rebaño y hacer del TE una aventura rentable (de la Fuente, 2010).

II.6.1.1.- Criterios genéticos de selección

Si consideramos el trasplante de embriones como una herramienta para la mejora genética, será este aspecto el primero a tener en cuenta, lógicamente los criterios de selección deben estar íntimamente relacionados con la rentabilidad.

En primer lugar es importante descartar aquellos animales con enfermedades de transmisión genética; la siguiente relación son las enfermedades para las que los sementales que entran en los centros de IA son testados para garantizar que están libres de ellas.

- BD: Bulldog ¹.
- BLAD: Deficiencia de adhesión Leucocitaria en Bovino ¹.
- BY: Brachispina.
- CVM: Complejo de malformación de la columna vertebral.
- DUMPS: Deficiencia de Uridin Monofosfato Sintetasa.
- MF: Pié de Mula ¹.
- PT: Porfiria.

(1): Portadores del gen recesivo.

Antes de superovular una vaca, debemos conocer su capacidad de transmisión, durante años se han estado superovulando muchas vacas que no cumplen con las cualidades genéticas requeridas para la transmisión de caracteres rentables a sus descendientes. Así muchas vacas, bajo la vista de su propietario, parecen de mayor valor genético que el que en realidad tienen (Cassell, 1990).

Hasta hace relativamente poco tiempo, los criterios de selección estaban basados fundamentalmente en el “pedigrí”, la procedencia de las vacas de familias denominadas “profundas” y sus caracteres fenotípicos, tanto de producción como de conformación. En el caso de la producción de leche, se hablaba de vacas con tres o cuatro generaciones de madres “Excelentes” o “Muy Buenas”, con una producción de 10.000 litros o más (Cassell, 1990; Van Doormal, 1991). Efectivamente, estos criterios han resultado de gran valor hasta la aparición de los índices genéticos de vaca.

Las ideas apuntadas anteriormente hacían pensar que la vaca más productora del rebaño era la mejor candidata como donante de embriones, esperando que tuviese el mayor índice genético para leche. Sin embargo, a pesar de existir una gran relación entre ambas (producción e índice), no tiene porqué ser así. La aparición y puesta a punto de la metodología BLUP (Modelo Animal), nos permite obtener unos índices genéticos



de vaca muy fiables y de gran valor para acometer, con criterios objetivos, la selección de nuestra vaca donante. Para obtener el índice genético de una vaca, se incorporan los valores de su propia lactación, la de todos sus familiares y la de todas sus compañeras de rebaño, siendo todas las conexiones familiares utilizadas para estos cálculos (Burnside, 1992).

EL Índice Genético de una vaca nos indica lo que la vaca transmite a su descendencia, es decir, nos habla entre otros aspectos, de la capacidad de producción que tendrán sus descendientes. Además, debemos considerar que cada lactación de una vaca posee unas circunstancias de producción, no trasmisibles, que pueden cambiar a lo largo de la vida productiva y ser distintas a las de sus compañeras de establo o al resto de la población, entre las que cabe destacar, la alimentación, la edad al primer parto, el número de lactación, intervalo entre partos, el mes y el año del parto. Todas estas circunstancias ambientales, hacen que las producciones observadas de un animal no sean un criterio preciso para decidir qué animales son los candidatos más idóneos para ser sometidos a superovulación (Barret, 1992).

Estos índices genéticos están referidos tanto a caracteres productivos (leche, grasa, % de grasa, proteína y % de proteína), como a caracteres morfológicos (calificación final, apariencia general, carácter lechero, capacidad corporal, grupa, miembros y aplomos, sistema mamario, ubre anterior, ubre posterior y tamaño). Por todo ello, se ha creado el Índice Combinado de Producción y Tipo (**ICO**), que unifica a los principales factores que afectan a la rentabilidad, producción, morfología y caracteres secundarios, cada vez más importantes, como células somáticas, vida productiva y facilidad de parto. Los índices genéticos de vaca están disponibles en el Estado Español dos veces al año, coincidiendo con las evaluaciones genéticas realizadas.

Actualmente en la mejora genética, podemos considerar que estamos en la era de la genómica. La selección genómica es la predicción del mérito genético utilizando esta información genómica, con genotipados de alta densidad. El primer artículo sobre genómica fue publicado por Meuwissen *et al.* (2001), en el que afirman que la selección genética en valores predichos a partir de marcadores, podría aumentar sustancialmente la tasa de ganancia genética en animales y plantas, especialmente si se combina con técnicas de reproducción para acortar el intervalo generacional. En 2009, se publica la primera evaluación genómica oficial en vacuno de leche en USA. Las modernas tecnologías de secuenciación y genotipado del ADN, nos permiten conocer miles e incluso millones de variantes a lo largo del genoma de los animales; estas variaciones son responsables de que unos animales sean más o menos productivos, tengan mejor o peor conformación y sean más o menos resistentes a determinadas enfermedades. El reto está en saber identificar y asociar cuáles de estas variantes están asociadas a cada uno de los caracteres y cuál es su efecto sobre ellos. La suma de estos efectos para un determinado carácter es lo que se llama el valor genómico directo (**VGD**) (González Recio *et al.*, 2010), para cuyo cálculo se usa un gran número de marcadores situados a lo largo de todo el genoma (actualmente, unos 50.000 polimorfismos de un solo nucleótido) (**SNPs**). Los SNPs o marcadores, nos van a proporcionar señales de las regiones genómicas asociadas a los caracteres de interés (económicos, funcionales o de resistencia a enfermedades). Los índices genómicos resultantes en animales jóvenes, tienen una fiabilidad aproximada del 70% (dependiendo del carácter), frente a los índices de pedigrí, que es del 45-50%; nos permiten por tanto, una mayor presión de selección, reducen el intervalo generacional y nos proporcionan un mayor progreso



genético; la combinación del VGD y el Índice Genético nos proporciona el Índice Genético Combinado, (**GICO**), que es el valor genético oficial en España. Actualmente, todos los toros españoles que están entre los 100 mejores tienen valoración genómica y todo ternero macho candidato a entrar en un centro de IA, se genotipa previamente. CONAFE realizó su primera valoración genómica en diciembre de 2012 y, desde entonces, se están genotipando unos 3.000 animales por año. En la Unión Europea, en los países de nuestro entorno, Francia está genotipando alrededor de 120.000 y, entre 30.000 y 40.000, Alemania, Holanda y Países Nórdicos, competidores nuestros en genética y en la industria láctea. En estos momentos, cuatro equipos de TE, ligados a los principales centros de I.A. de la UE, están genotipando embriones. Al núcleo de donantes seleccionadas se les realizan varias superovulaciones y sesiones de OPU para obtener entre 200 y 750 embriones que son genotipados y sexados anualmente, dependiendo del equipo. Los embriones machos se congelan hasta conocer su valor genómico y los embriones hembra, se transfieren en fresco o se congelan. Dependiendo del valor genómico de los embriones machos, se transferirán los mejores y al nacer, entran en el centro de IA (AETE 2014, newsletter 42); esto implica una gran intensidad de selección, una disminución del intervalo generacional y por lo tanto un mayor progreso genético.



Foto 2: Dos vacas de alto valor genético, hijas de madre nacional, nacidas de trasplante de embriones, y madres de sementales.

II.6.1.2.- Criterios no genéticos de selección

Teniendo en cuenta que el aspecto más importante es la genética de la donante y que no se pueden superovular aquellas donantes que no cumplan con los requisitos sanitarios establecidos en la Directiva 89/556/CEE y del Real Decreto 855/1992, que hace especial referencia a la sanidad de las ganaderías, donantes y embriones; los criterios no genéticos, son recomendaciones a valorar, con el objetivo de obtener los mejores resultados reproductivos posibles, pero no son excluyentes.

Las donantes deben ser consideradas tanto de forma individual o como integrantes de un rebaño y por lo tanto condicionadas por el manejo que el ganadero realiza en su ganadería. A la hora de decidir superovular o no y cuando, deberemos estudiar y valorar aquellos factores ligados tanto al individuo como al rebaño.

Una vez elegidas las hembras genéticamente superiores se ha de valorar el historial reproductivo de la donante, entre los aspectos más importantes se encuentran los antecedentes de abortos, retenciones placentarias, metritis, quistes y cesáreas, ya que



reducen la probabilidad de una producción óptima de embriones (Hahn *et al.*, 1977 y Greve, 1982).

Con el fin de tener la seguridad de que se ha restablecido la función ovárica normal, se deberán detectar 2-3 ciclos sexuales completos y regulares después del parto. Ello da lugar a un intervalo parto-superovulación mínimo de 60-90 días, siendo el óptimo, de 90-120 días (Greve, 1982).

Es importante realizar una exploración exhaustiva de la donante el día del inicio del tratamiento para evaluar el estado ginecológico por exploración rectal o por ecografía para descartar problemas reproductivos y confirmar la presencia de un CL de buena conformación; descartar cualquier proceso patológico, nutricional, infeccioso o de cualquier índole que pueda afectar al tratamiento de superovulación, como mastitis, cojeras, indigestiones o procesos diarreicos. La donante, tiene que estar sana en el momento de iniciar el tratamiento.

II.6.2.- Superovulación de donantes

El fundamento del TE radica en la sobreestimulación de los ovarios de la hembra donante para producir un elevado número de ovulaciones y así conseguir el mayor número de embriones fecundados y desarrollados en un solo ciclo sexual. Para alcanzar este fin, es necesaria la utilización de hormonas gonadotropas exógenas.

Este capítulo se desarrollará más adelante, en el capítulo “II.7.2.6 tratamientos de superovulación: métodos empleados”.

II.6.3.- Colecta de embriones

Entre el sexto y octavo día (día 0 = día del celo y de la IA), se procede a la obtención de los embriones producidos, ya que antes de este momento, algunos embriones pueden permanecer aún en los oviductos (Newcomb *et al.*, 1976), aunque actualmente, el día de elección en la mayoría de los equipos de TE es el día 7, después de la primera IA.

La colecta y transferencia de embriones de forma quirúrgica en ganado vacuno está en desuso desde hace más de 25 años. Actualmente, todos los equipos realizan la colecta de los embriones de forma no quirúrgica, con diferentes variaciones en la forma de realizarla.

Cuando las colectas se realizan en la ganadería, es necesario disponer de un local limpio, separado del resto de los animales y con un sistema de sujeción apropiado.

En primer lugar se realiza una anestesia epidural baja (Hall, 1974; Lumb and Jones, 1979), se inyecta 4-6 ml de lidocaina (2%).

Se procede al vaciado del recto, es aconsejable levantar un poco las extremidades anteriores (con el fin de evitar la entrada de aire en el recto), que puede dificultar la manipulación del tracto uterino. Se lava la región perineal y labios vulvares con agua y jabón desinfectante y se seca, la cola se ata a un costado de la donante.



Para la recuperación de los embriones, se utiliza un fosfato bufer salino (**PBS**) (con un $\text{pH} = 7,3 \pm 0,4$ y osmolaridad = 285-300 miliosmoles/Kg), que se introduce en el útero mediante sondas Foley de dos o tres vías, o el modelo Neustadt Aisch (**Rush**), o sondas de silicona desechables. La colocación de la sonda puede ser profunda, (pasada la curvatura del cuerno uterino), lo más profunda que se pueda sin hacer daño, o poco profunda, más o menos en la curvatura del cuerno uterino. Para fijar la sonda y cerrar el cuerno uterino, se introduce una cantidad de aire o PBS en el pequeño balón que lleva la sonda, la cantidad de aire o PBS, dependerá de la posición en que hayamos colocado la sonda, hay que controlar con la mano, vía rectal, el inflado del balón ya que una presión excesiva provocará heridas, y una presión escasa, implica un desplazamiento del balón y pérdidas de PBS. La elección entre aire o PBS, es indiferente.

Existen diferentes formas de introducir el PBS:

- Con jeringa, directamente conectada a la sonda, en este caso se extrae el PBS en la misma jeringa; (implica controlar con la mano, vía rectal, la cantidad de PBS que estamos introduciendo). Normalmente una vez extraído el PBS con la jeringa, se deposita en un filtro para embriones.
- Normalmente, en colocaciones de sonda poco profundas, se introduce el PBS por gravedad, uniendo la sonda a la bolsa de PBS mediante un sistema de tuberías en “Y” que a su vez, está conectado al filtro de embriones. Este sistema también conlleva el control manual, vía rectal, de la cantidad de PBS que estamos introduciendo.
- Cuando la sonda se coloca muy profunda, es necesario un control manual, vía rectal, de la cantidad de PBS a introducir, pero sólo las primeras veces, después se puede realizar todo el lavado sin la necesidad de tener la mano en el recto controlando la cantidad de PBS. Este sistema se compone de una tubería en “Y” que conecta la bolsa de PBS con la sonda pero introducimos en medio una válvula de 3 vías o una antirreflujo que está conectada a la jeringa y con la cual introducimos pequeñas cantidades de PBS, del orden de 30 a 40 cc cada vez. El extremo libre de la “Y” termina en un filtro de embriones.
- El volumen total empleado para cada cuerno uterino varía según el criterio del operador, entre 500-700 ml (Munar *et al.* 1989) y 1.000 ml (König and Rommel, 1987).
- Actualmente, los embriones se recogen en filtros especiales tipo “**Em-Con**®” (Immuno Systems, Inc.) existiendo diferentes marcas en el mercado; estos filtros permiten el paso de líquido, pero no de embriones.



Foto 3: Aplicación de anestesia epidural ganado vacuno

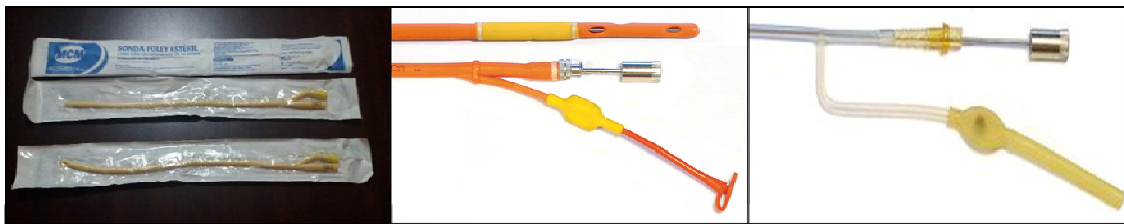


Foto 4: Sondas Foley, cateter Neustadt Aisch (Rush) y sonda desechable de silicona para recolección de embriones bovinos.

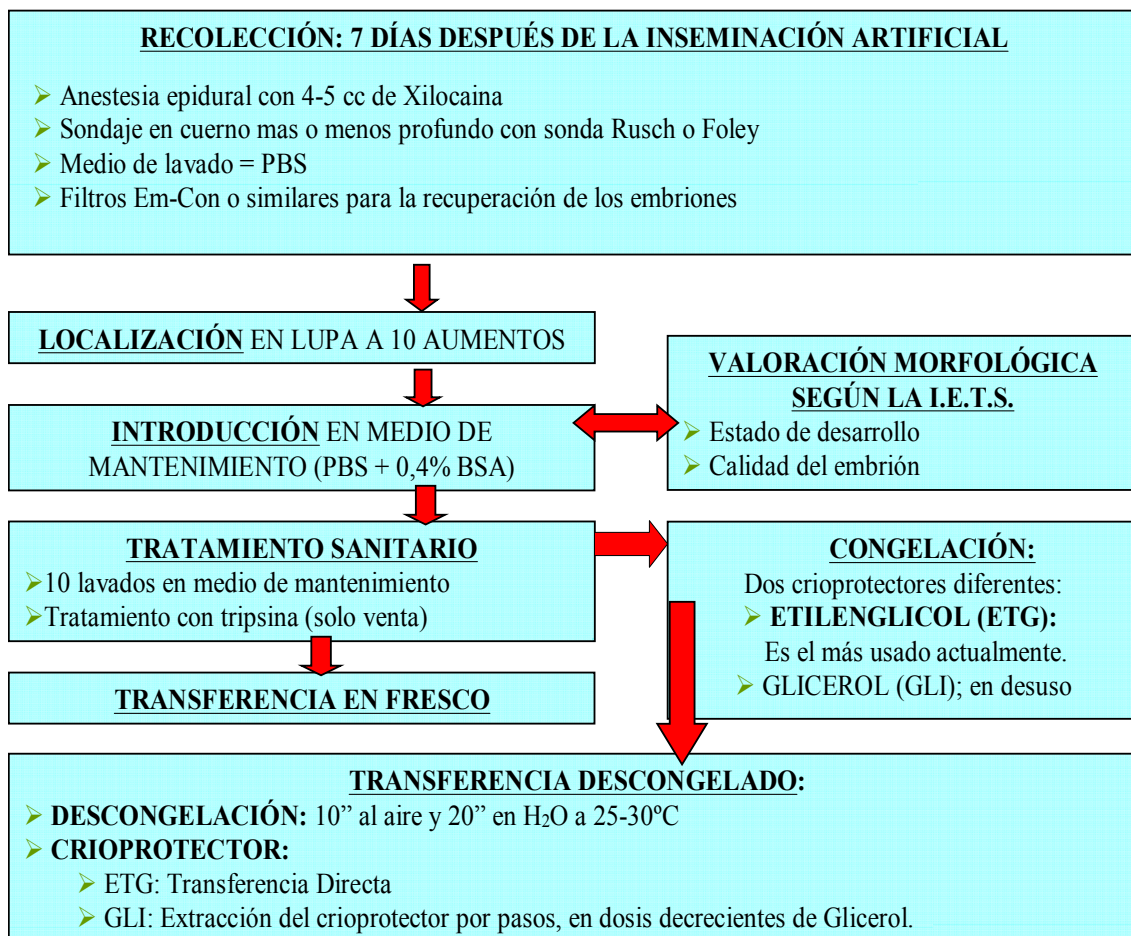


Figura 13: Esquema del procedimiento de recolección de embriones.

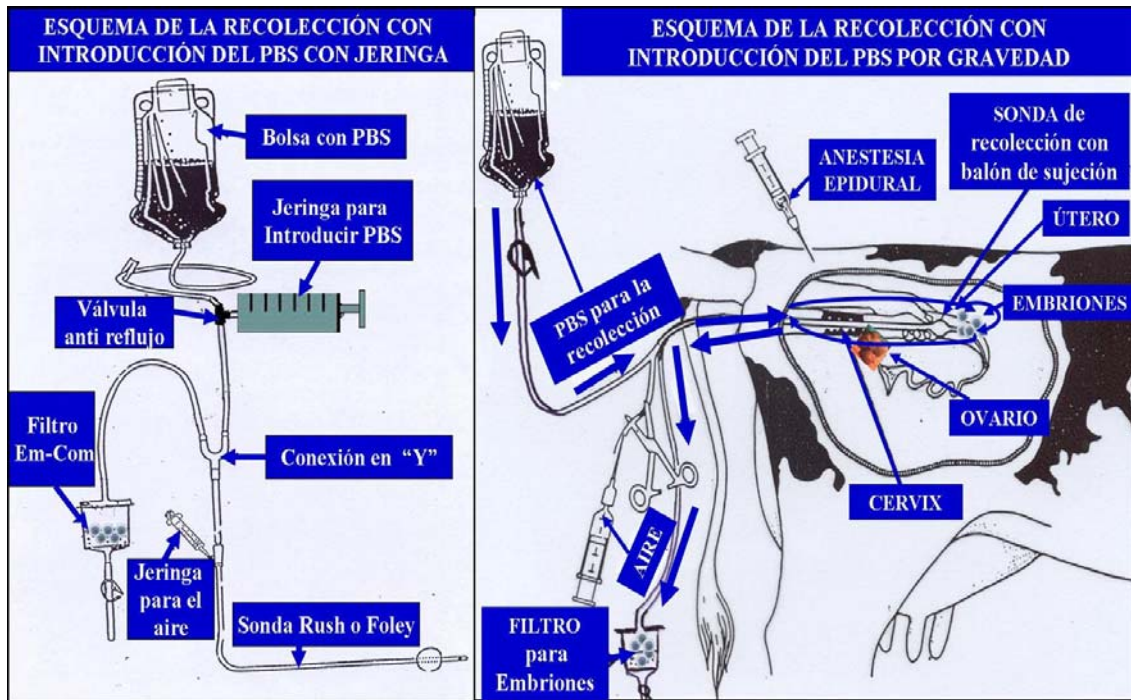


Figura 14: Esquema de recolección de embriones bovinos, técnica no quirúrgica. Recolección con introducción del PBS con jeringa y recolección con introducción del PBS por gravedad. (Adaptado por Fuentes and de la Fuente).



Foto 5: PBS de 2 litros, filtro de embriones (Em-Con) y sistema de tuberías en “Y”.

II.6.4.- Búsqueda y manipulación de los embriones

Si la colecta se realiza en la ganadería, la búsqueda y manipulación de los embriones debe hacerse en un laboratorio móvil que cumpla los requisitos de la Directiva 89/556/CEE y del Real Decreto 855/1992, que hace referencia a las condiciones que debe reunir el laboratorio móvil y su equipamiento.

Una vez realizada la colecta, el PBS que se encuentra en el filtro y contiene los embriones, se deposita en una placa petri con cuadrículas para poder realizar la búsqueda de los mismos. Los embriones se localizan en una lupa estereoscópica a 10 aumentos y una vez localizados, se extraen con una micropipeta y se introducen en una



placa de petri de un único pocillo o de varios y que contiene medio de mantenimiento, PBS + 0,4% de albúmina sérica bovina (BSA).

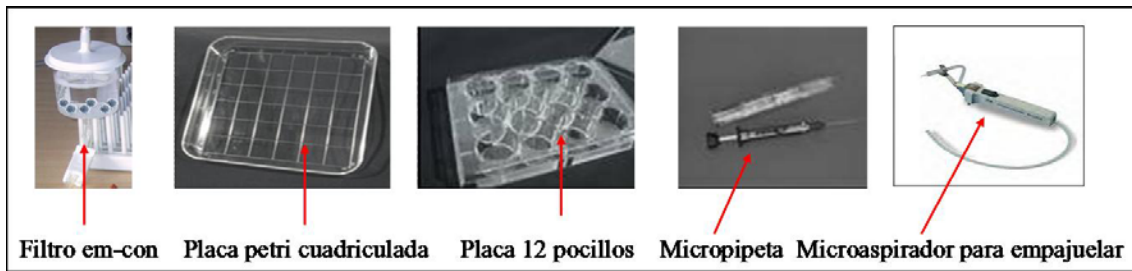


Foto 6: Filtros, micropipetas, placas Petri y microaspirador para empajuelar.

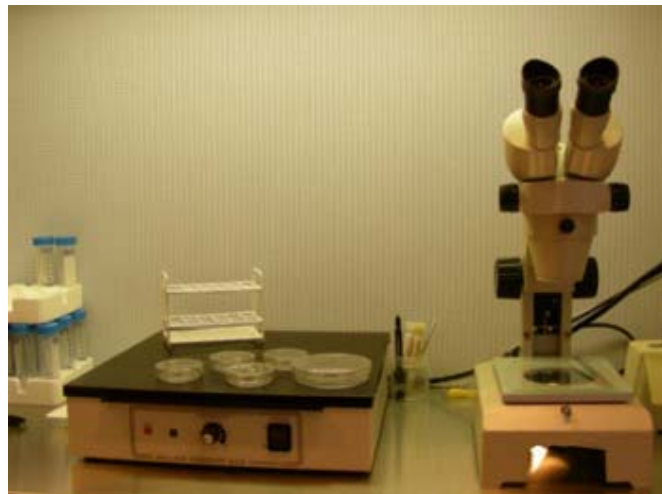


Foto 7: Estación de trabajo para búsqueda de embriones bovinos.

A partir de este momento los pasos a seguir son:

1. Separar los embriones transferibles (viables), de los degenerados o no fecundados.
2. Calificar los embriones según las recomendaciones de la IETS:
 - Por su estado de desarrollo.
 - Por su calidad.
3. Diez lavados (en medio de mantenimiento estéril).
4. Tripsinización, si son para exportación.

II.6.4.1.- Valoración morfológica de los embriones por su estado de desarrollo

Según los criterios descritos en 2010 en el Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, (Cuarta Edición), los embriones han de ser catalogados de acuerdo a su estadio de desarrollo (Figura 17), nombrándoles del 1 (estadio de una célula) al 9 (estadio de blastocisto eclosionado expandido).

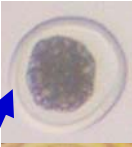


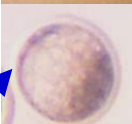





VALORACION MORFOLOGICA SEGUN LA I.E.T.S.: ESTADO DE DESARROLLO

CODIGOS I.E.T.S.	ESTADO DE DESARROLLO	DÍAS
1	NO FECUNDADO	
2	DE 2 A 16 CÉLULAS	2-4
3	MÓRULA	5-6
4	MÓRULA COMPACTADA	6
5	JOVEN BLASTOCISTO	6-7
6	BLASTOCISTO	7-8
7	BLASTOCISTO EXPANDIDO	8-9
8	BLASTOCISTO ECLOSIONADO	9-10
9	BLASTOCISTO ECLOSIONADO EXPANDIDO	9-10

PRESENTACIONES EXCEPCIONALES

PRESENTACIONES NORMALES

Manual de la International Embriotransfer Society I.E.T.S.

Figura 15: Valoración morfológica del estado de desarrollo de los embriones.

El diámetro de un ovocito es de aproximadamente 140-170 μ , incluyendo el grosor de la zona pelúcida. El diámetro del ovocito permanece prácticamente sin variación desde el estado de 1 célula, hasta el estado de blastocisto. El número de células de un embrión puede ser contado sin dificultad hasta el estado de 16 células, hasta este estado, los embriones se dividen geométricamente, después las células se dividen asincrónicamente y la individualización se hace dificultosa.

Cuando el embrión alcanza el estado de 32 células, se produce la compactación, en la cual los blastómeros pierden su forma esférica y comienzan a adherirse entre ellos. En este estado el embrión recibe el nombre de mórula compactada. Posteriormente, en el estado de blastocisto, los blastómeros comienzan a diferenciarse, dando origen a dos tipos de células, las células del trofoblasto y las del botón embrionario. Las primeras, darán origen a la placenta y el botón embrionario, dará origen al feto.

La zona pelúcida, refleja la luz del microscopio observándose como una estructura transparente y en su interior, están los blastómeros (de un color más oscuro), lo que ayuda a la búsqueda del embrión.

El estado de desarrollo debe estar en concordancia con el estado teórico en el día de la colecta de los embriones, si esta se realiza el día 7 posinseminación, lo normal es encontrar mórulas compactadas “4”, jóvenes blastocistos “5” y blastocistos “6”,



excepcionalmente, podemos encontrar mórulas sin compactar “3” o blastocistos expandidos “7”.

Descripción de los estados de desarrollo más interesante para el TE:

a) Mórula “3”:

Se asemeja a una mora. La masa de células (embrión), ocupa casi todo el espacio intrazonal; los blastómeros están individualizados y se aprecian bien; (edad estimada: 5-6 días).

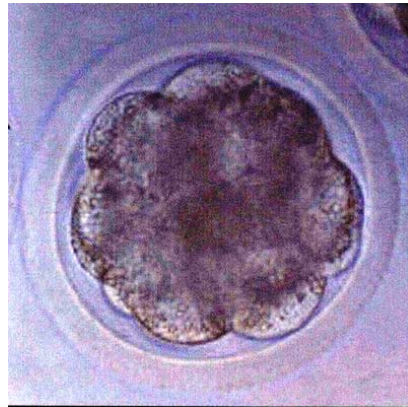


Foto 8: Mórula sin compactar.

b) Mórula compactada “4”:

Los blastómeros pierden su forma esférica y al adherirse entre ellos, forman una única entidad. El embrión ocupa el 60-70% del espacio intrazonal (edad estimada: 6 días).

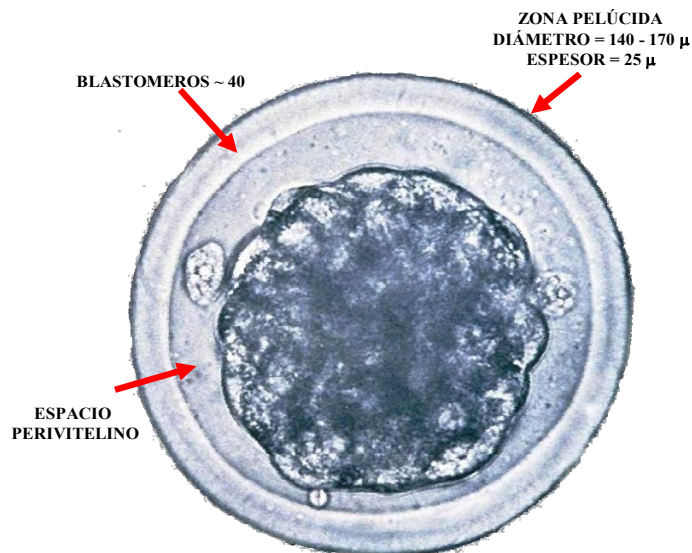


Foto 9: Mórula compactada.



c) Blastocisto joven (temprano) “5”:

Presenta una cavidad con fluido (el blastocele), y se visualiza el trofoblasto. El embrión ocupa 70-80% del espacio perivitelino (edad estimada: 7 días).

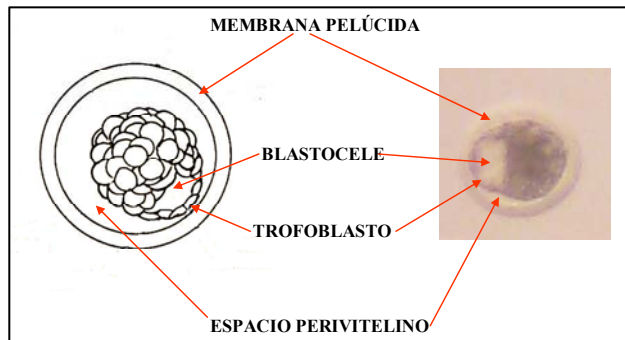


Foto 10: Blastocisto Joven (temprano)

d) Blastocisto “6”:

En este estado se aprecia claramente el trofoblasto, un gran blastocele y el botón embrionario. El embrión ocupa casi todo el espacio perivitelino (edad estimada: 7-8 días).

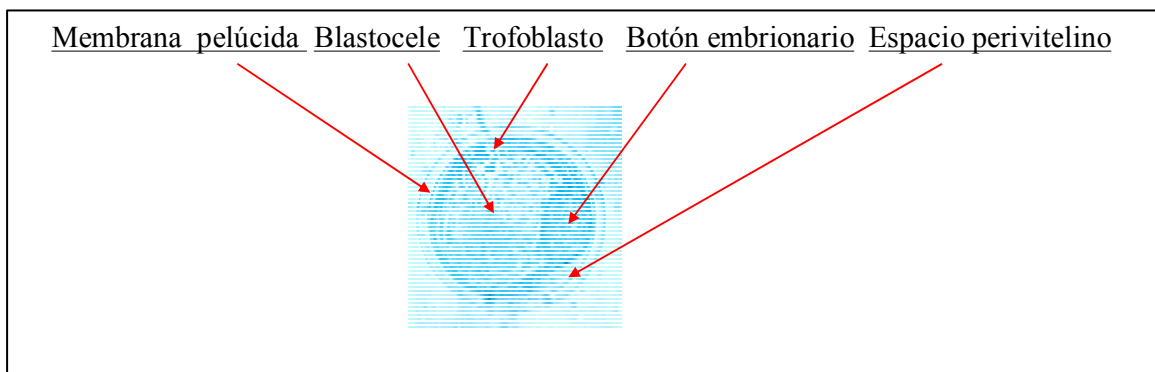


Foto 11: Blastocisto (Julio de la Fuente).

e) Blastocisto expandido “7”:

El diámetro aumenta 1.2 a 1.5 veces, la zona pelúcida se adelgaza aproximadamente 1/3 del grosor original. Los embriones en este estado se colapsan y se reexpanden hasta producirse la eclosión (edad estimada: 8-9 días).



Foto 12: Blastocistos expandidos.



f) Blastocisto eclosionado y blastocisto eclosionado expandido “8” y “9”:

En este estado, los embriones pueden estar eclosionando o estar completamente fuera de la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados son esféricos, con el blastocele bien formado o colapsado. Es muy difícil en este estado la identificación del embrión (edad estimada: 9-10 días).

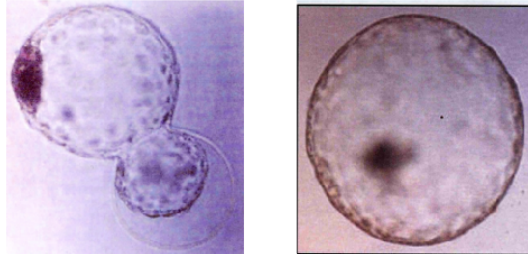


Foto 13: Blastocisto expandido eclosionando y blastocisto expandido eclosionado.



Foto 14: Manipulación de embriones bovinos.

II.6.4.2.- Clasificación de los embriones según su calidad

La determinación de la calidad del embrión es una apreciación subjetiva. Es muy importante determinar la calidad lo más exactamente posible, ya que ésta influye en los porcentajes de gestación y en el valor comercial de los embriones. Hasler (2001), encuentra diferencias significativas ($P < 0,05$), entre las diferentes calidades de los embriones, tanto en los transferidos en fresco, como en los transferidos congelados-descongelados.

Se clasifican en base a sus características morfológicas y con los parámetros establecidos por la IETS. Las características morfológicas más importantes a tener en cuenta son:

- El estado de desarrollo del embrión debe estar en concordancia con el estado teórico en el día de la colecta.
- Forma general: esfericidad e integridad de la zona pelúcida.



- Opacidad.
- Estructuras visibles.
- Blastocelo e integridad del trofoblasto.
- Botón embrionario.
- Estado de agregación de las células.
- Diferencias de tamaño entre células.
- Presencia de células separadas en el espacio perivitelino (lo más habitual).
- Integridad de las células.

De acuerdo con estas pautas, los embriones se clasifican en:

1) Excelente (calidad 1): el embrión es esférico, simétrico, con tamaño y color normales; el estado de desarrollo se corresponde con el esperado en el día de la colecta. La zona pelúcida es lisa, sin rugosidades. No presenta imperfecciones aunque la IETS permite pequeñas defectos siempre que como mínimo, el 85% del embrión este perfecto.

2) Regular (calidad 2): presenta irregularidades moderadas en la forma y o en el tamaño y color, y algunas células aparecen separadas del embrión, en el espacio perivitelino. Por lo menos el 50% del embrión, debe permanecer intacto.

3) Malo (calidad 3): presenta mayores irregularidades en la forma y tamaño, mucho material celular separado del embrión y repartido por el espacio perivitelino. Por lo menos, el 25% del material celular debe permanecer intacto.

4) Muertos o degenerados (calidad 4): ovocitos o embriones de una o más células que no se corresponden con el estado de desarrollo teórico, o completamente degenerados.

Los embriones de calidad 1, son los mejores para congelar; los de calidad 2, pueden ser congelados con peores resultados (pero aceptables para ser transferidos en fresco), los de calidad 3, tienen índices de preñez regulares y son raramente transferibles (Valencia, 2009a).

II.6.5.- Conservación de embriones y congelación

Una vez obtenidos los embriones, podrán ser transferidos a las hembras receptoras, sincronizadas con la donante, tan pronto como sea posible; no obstante, en caso de necesidad, los embriones pueden ser conservados a bajas temperaturas, (entre 0° y 4°C), sin que se aprecie una pérdida de viabilidad en las primeras 24 horas, decreciendo en un 50% a las 48 h y perdiéndose totalmente, a las 120 h (Lindner *et al.*, 1983).

La congelación es la metodología de elección para la conservación y transporte a largas distancias. La congelación de embriones permite el mantenimiento de la viabilidad embrionaria por largos períodos de tiempo y en consecuencia, contribuye a aumentar el rendimiento de un programa de superovulación, al no perder embriones cuando no se dispone del número suficiente de receptoras, tanto en cuanto a su cantidad, como a su calidad.



Es importante resaltar el hecho de que solo los embriones de excelente calidad y con el grado de desarrollo normal, son los más adecuados para ser sometidos al proceso de congelación, ya que otras categorías ofrecen unos porcentajes de gestación inferiores e incluso nulos (de la Fuente *et al.*, 1989 y Fuentes *et al.*, 1991).

La congelación de los embriones nos permite conservarlos indefinidamente, con porcentajes de supervivencia poscongelación superiores al 95% y porcentajes de gestación esperados superiores al 50%, por lo que es una técnica de vital importancia ya que no siempre hay disponibles suficientes receptoras para transferir en fresco y nos permite guardarlos para transferirlos cuando dispongamos de receptoras, además, nos facilita el comercio de embriones. Según las estadísticas de la AETE en Europa, entre el 55% y 60% de los embriones que se transfieren anualmente, son embriones congelados (AETE 1984-2014).

II.6.5.1.- Principios básicos de la congelación de embriones

La congelación de una célula viviente constituye un proceso físico-químico complejo de intercambio de calor y transporte de agua entre la célula y el medio que la rodea. Existe una velocidad de enfriamiento óptimo para cada tipo celular, dependiendo del tamaño de la célula, su relación de superficie/volumen, su permeabilidad al agua y el coeficiente de temperatura de esa permeabilidad. En el caso de la congelación de embriones, el objetivo principal es la viabilidad del embrión en las etapas de congelación y descongelación. Para ello debe respetarse la tasa de enfriamiento, y evitar la formación de cristales, que puedan llegar a destruir las células.

Normalmente, el medio de congelación que contiene los embriones se enfría por debajo del punto de congelación sin la formación de cristales, este fenómeno se llama super enfriamiento, y posteriormente (a una temperatura más baja), se forma el núcleo de congelación, seguido por la liberación del calor latente de fusión, que produce un aumento de temperatura hasta la temperatura del cambio de estado. Para evitar este inconveniente, la formación del núcleo de congelación es inducido en el medio extracelular, alrededor de 2°C por debajo del punto de congelación del medio, proceso conocido como "seeding" o siembra. En la congelación controlada de embriones, el embrión va sufriendo un proceso de deshidratación paulatina. El agua dentro del embrión y entre los cristales de hielo, no se congela a esta temperatura, porque los solutos en el agua descienden el punto de congelación. En un mayor descenso de temperatura, los cristales de hielo se agrandan, la concentración de solutos aumenta y los embriones responden osmóticamente perdiendo agua al medio extracelular aún no congelado.

Los embriones pueden ser dañados durante la congelación y descongelación, principalmente debido a los efectos de solución o a la formación de cristales intracelulares. Para evitarlo el daño, los embriones se deben congelar a temperaturas menores de 1°C/min. Esto es, no tan rápido como para impedir la salida de agua con la consecuente formación de cristales intracelulares, ni tan lento como para que la excesiva concentración de sales afecte a los embriones. Los embriones normalmente se almacenan en nitrógeno líquido a -196°C. Las únicas reacciones que ocurren a esa temperatura son ionizaciones directas debidas a radiaciones de fondo. Consecuentemente, en un tiempo de almacenamiento de 200 años es improbable que afecte la supervivencia de los embriones congelados. (Cabodevila and Teruel, 2001).



Cuando realizamos un enfriamiento lento del embrión con crioprotector, a una velocidad de descenso de la temperatura de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, damos tiempo para que salga agua del embrión y no se formen cristales de hielo dentro de las células, entonces tenemos tasas de supervivencia altas; mientras que si el ritmo de descenso es rápido, a medida que aumenta la velocidad de descenso, aumenta el hielo intracelular y disminuye la supervivencia (Figura 16).

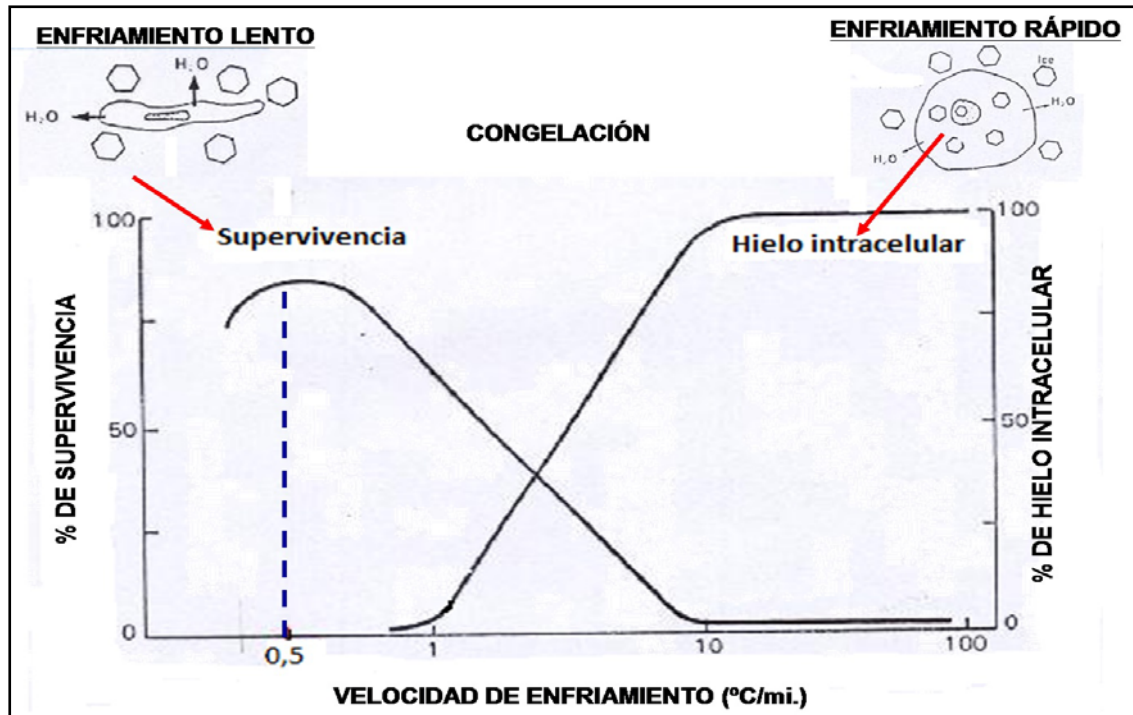


Figura 16: Efecto de la velocidad de congelación y la tasa de supervivencia.

II.6.5.2.- Crioprotectores

La función de los crioprotectores es la de proteger a las células de lesiones producidas por la congelación. Existen muchos tipos de crioprotectores, que se agrupan según la posibilidad de penetración o no de las membranas celulares. Así existen:

- Crioprotectores permeables: los más utilizados: glicerol, dimetil sulfóxido, etilenglicol, 1,2 propanodiol.
- Crioprotectores no permeables: (que no atraviesan la membrana), los más utilizados son: sacarosa, dextranos y polivinil pirrolidona.

Se cree que los crioprotectores actúan reduciendo la cantidad de hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación, moderando así los cambios en concentración de solutos. Un buen crioprotector debe tener alta solubilidad, baja toxicidad a altas concentraciones y un bajo peso molecular para lograr una mayor permeabilidad y para obtener el máximo efecto coligativo. Hace unos años, el glicerol era el crioprotector más utilizado en la congelación de embriones bovinos, actualmente el etilenglicol es el más usado, ya que permite la transferencia directa (**TD**), con un importante ahorro de costes. Cuando el embrión se expone a los crioprotectores, inicialmente se contrae, por la pérdida de agua a causa de la hiperosmolaridad de la solución extracelular y porque el embrión es más permeable al agua que al



crioprotector. La contracción va a continuar hasta que el reflujo del agua es equilibrado por el influjo de crioprotector. El crioprotector entrará al embrión a una velocidad que dependerá del coeficiente de permeabilidad y la temperatura. Posteriormente, el agua se reintroducirá a la célula, siendo el equilibrio completo cuando el volumen de agua de los embriones alcanza su volumen isotónico original. La respuesta opuesta ocurre cuando el crioprotector se extrae de la célula. Cuando la concentración del crioprotector disminuye inicialmente, el agua entrará al embrión y si la dilación no se lleva a cabo con cuidado, las células pueden dilatarse hasta un tamaño perjudicial.

Después de la descongelación, deberemos extraer el crioprotector del embrión. El método empírico es el de diluir paso a paso con PBS pipeteando los embriones por soluciones de concentración decreciente, por ejemplo en pasos de 0.25M. En realidad este procedimiento ha caído en desuso, debido a su complejidad. Actualmente, se utilizan solutos no permeables como la sacarosa, en el medio de dilución que debe tener un volumen 10 veces mayor que el volumen de medio que contiene al embrión. La sacarosa actúa como fuerza osmótica para restringir el movimiento del agua a través de la membrana. La contracción y la expansión de los embriones observada durante el tratamiento con sacarosa, es una indicación de la integridad de la membrana, y que ésta no fue afectada por la congelación. Existen dos procedimientos diferentes para la retirada del glicerol, uno es introduciendo los embriones directamente en una solución compuesta por PBS + 0,4% BSA y sacarosa 1M; después de 7 minutos, se lavan en PBS + 0,4% BSA y quedan listos para la transferencia. El otro procedimiento, consiste en utilizar soluciones decrecientes de glicerol en PBS + 0,4% BSA, así pasaremos del 10% de glicerol (medio de congelación), al 6% de glicerol y sacarosa 0,3M, 3% de glicerol y sacarosa 0,3M y 0% de glicerol y sacarosa 0,3M y finalmente, en el medio de transferencia; los embriones se mantienen 5 minutos en cada etapa.

El uso del etilenglicol 1.5M como crioprotector, proporciona una importante ventaja frente al glicerol, dado que no es necesario el uso de sacarosa para extraer al crioprotector y los embriones pueden ser transferidos directamente, ya que los embriones volverán a su estado original al contacto con el medio intrauterino.

II.6.5.3.- Protocolo tradicional de congelación, descongelación de embriones, empajuelado, identificación y almacenamiento

El protocolo tradicional de congelación y descongelación de embriones recoge una serie de fases que a continuación describiremos:

1. Seleccionar los embriones de buena y excelente calidad (calidad 1, según la IETS).
2. Para congelar los embriones en glicerol, se puede realizar de dos formas:
 - a) Introducir directamente los embriones en una solución de PBS+0,4% BSA y 10% de glicerol durante 10 minutos a temperatura ambiente (20°C) (fue el procedimiento más usado).
 - b) Introducir los embriones en soluciones de glicerol (2 pasos): 0.75M por 5-10 minutos, y 1.5M por 6-10 minutos.



3. Para congelar los embriones en etilenglicol, se introducen directamente en una solución que contiene PBS+0,4% BSA + etilenglicol 1,5 molar y sacarosa 0,1 molar a temperatura ambiente (20°C), durante 8 a 10 minutos.
4. Colocar los embriones con la solución crioprotectora en pajuelas de 0.25 ml; para introducir el embrión dentro de la pajuela, se utiliza un microaspirador (Foto 6), se coloca la pajuela en el microaspirador por la parte del tapón de algodón; se aspira un poco de medio de congelación y seguidamente un poco de aire de manera que se forma una pequeña cámara de aire, se aspira más medio de congelación con el embrión y otro poco de aire, de esta forma, tenemos al embrión en medio de la pajuela, separado del resto por dos burbujas de aire; se aspira más medio de congelación y se pone el tapón que cierra la pajuela y se conecta con otra pajuela de 0,50cc que sirve para identificar el embrión (también se pueden sellar las pajuelas con alcohol de polivinilo o con calor) (Figuras 17 y 18).

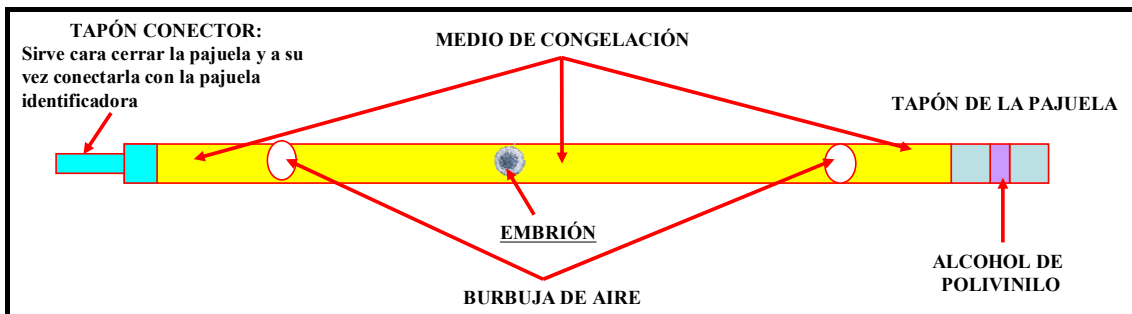


Figura 17: Empajuelado del embrión.

5. Identificación de los embriones:

- Para la TD todos los identificadores deben ser de color amarillo.
- Se puede usar como identificador:
 - Otra pajuela, pegada o unida por un conector (método más usado).
 - Juncos identificadores que sirven también para cerrar la pajuela.
 - En la misma pajuela: directamente escrito (totalmente en desuso).
- Información a incluir en la identificación del embrión según la IETS.

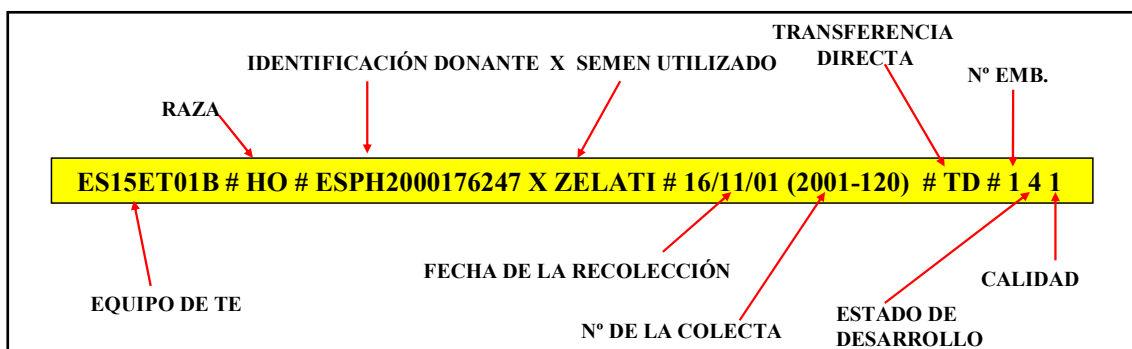


Figura 18: Identificación del embrión.

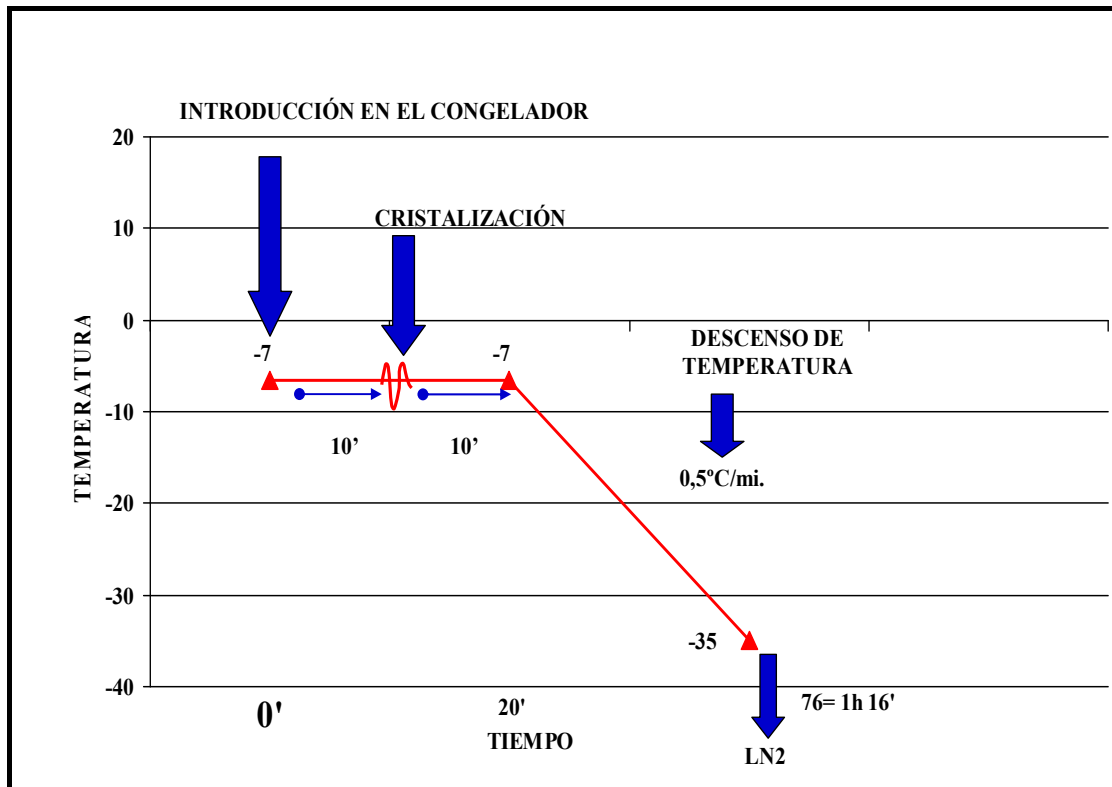


Figura 19: Curva de congelación.

6. Colocar las pajuelas en el congelador que ya está preparado entre -6°C y -7°C y se deja equilibrar por 8-10 minutos.
7. Inducción de cristales ("seeding"), tocando las pajuelas con unas pinzas previamente enfriadas en nitrógeno líquido. El "seeding" se realiza en el extremo superior de la columna del medio que contiene al embrión, (lo más alejado posible de éste).
8. Mantener a -6°C y -7°C por 8-10 minutos, para conseguir la estabilización.
9. Congelar a una velocidad entre 0.3°C - 0.5°C /minuto, hasta llegar a -35°C .
10. Almacenar en N_2 líquido. Los embriones una vez empajuelados y congelados, deben ser introducidos en visotubos que ya están en nitrógeno líquido y que llevan la misma identificación que la pajuela identificadora. Los visotubos van introducidos en racks de aluminio que llevan en un extremo una chapa con la identificación de la colecta. En el caso de los embriones congelados en etilenglicol para TD, la pajuela identificadora así como la chapa que va al final del rack, deben ser de color amarillo, según las indicaciones de la IETS (Figura 20). Nunca se deben almacenar juntos embriones de distintas colectas.



Figura 20: Sistema para almacenar los embriones.

11. Descongelación: la pajuela conteniendo al embrión se debe extraer del nitrógeno líquido lo más rápidamente posible y proceder a su descongelación, con alguna de las técnicas siguientes:
 - a) Agua tibia (20 a 35°C).
 - b) Aire a temperatura ambiente (22°C).
 - c) Aire 10 segundos y 20 segundos en agua a 25-30°C. Es el procedimiento más habitual.
12. Colocar el embrión en la solución de descongelación para los embriones congelados en glicerol:
 - a) Sacarosa 1M por 8-10 minutos.
 - b) Método de 3 pasos de 5 minutos (c/u): En 6% glicerol + 0.3M sacarosa. En 3% glicerol + 0.3M sacarosa En 0.3M sacarosa. Finalmente en el medio de transferencia, PBS + 0,4% BSA, evaluar la calidad poscongelación y transferir inmediatamente. (Valencia, 2009b).
13. En caso de utilizar ETG como crioprotector, la transferencia del embrión se realiza directamente sin necesidad de retirar el crioprotector.

II.6.6.- Selección de receptoras

La transferencia del embrión a la receptora es el último paso de este complejo proceso que es una sucesión de pasos, todos de vital importancia, para el éxito final, la gestación; la técnica en esta etapa ya solo depende de la correcta selección de la receptora y del compromiso entre receptora y embrión.

Todos los aspectos dependientes de las receptoras: características, sincronización, transferencia, serán abordados con mayor profundidad en el apartado dedicado a ellas, que recogemos en esta revisión bibliográfica (capítulo "II.8").



II.7.- Factores que afectan a la eficiencia del trasplante de embriones, relacionados con la donante y la receptora

El éxito de un programa de TE se mide por el número de descendientes que nacen vivos por hembra donante en un determinado periodo de tiempo (Peres *et al.* 2006).

Los resultados se ven afectados por una serie de factores *extrínsecos* como el medio ambiente, alimentación y manejo e *intrínsecos* como los inherentes a la donante, al embrión, a la aplicación de la técnica y a las receptoras (Duica *et al.*, 2007; Peres *et al.*, 2006).

Factores como la raza de los animales a utilizar, selección de la donante así como de la receptora, manejo de las hembras, la respuesta de los animales a los tratamientos de sincronización, la técnica para realizar la TE, el día en que se efectúa la transferencia del embrión, la calidad del embrión, la respuesta de la receptora al embrión transferido, interacción embrión-receptora, han sido estudiados tratando de estandarizarlos para obtener mejores resultados en el trasplante de embriones.

A continuación se describirán los factores más relevantes que pueden influir en el porcentaje de gestación en un programa de trasplante de embriones en ganado vacuno.

II.7.1.- Factores extrínsecos

Estos son los factores que se relacionan con medio ambiente que rodea al animal, incluye factores que afectan de alguna manera el desempeño o el bienestar, ejerciendo diferentes acciones que pueden modificar la fisiología del individuo.

II.7.1.1.- Medio ambiente

El medio ambiente como elemento constante en todo tipo de producción pecuaria, ejerce influencias positivas y negativas sobre el ganado.

Dentro de los factores ambientales, el estrés calórico ha sido uno de los que más se ha estudiado y numerosos trabajos revelan que reduce la fertilidad tanto en vacas productoras de leche (Wolfenson *et al.* 1988; Sartori *et al.* 2002a y 2002b; Barati *et al.* 2007) como en vacas productoras de carne (Dunlap and Vincent, 1971, citado por Barati *et al.* 2006).



Foto 15: Vacas Frisonas y vaca Brahman sujetas a condiciones de estrés por calor.



Franco *et al.* (2006), encontró diferencias estadísticamente significativas ($P=0,02$) en los porcentajes de preñez en programas de inseminación artificial para novillas Holstein en el estado de la Florida (Estados Unidos): 21,4% para los meses de octubre, noviembre, febrero y marzo; y 13,5% para los meses de calor (mayo a septiembre). Si bien estos datos son de programas de IA, este índice reproductivo puede ser un indicador de posibles alteraciones en los porcentajes de preñez en programas de TE; así, Ealy *et al.* (1993) y Edwards *et al.* (1997) (citado por Barati *et al.*, 2007), afirman que el estrés calórico tiene un efecto perjudicial sobre los embriones, sobre todo en las etapas tempranas de su desarrollo, al producirse un aumento en la concentración de radicales libres debido al shock térmico.

Jared McNaughtan (2004), en su trabajo señala tres causas de cómo el estrés térmico afecta el resultado de preñez en TE en novillas:

a) Es más dificultoso de detectar el estro en animales que están sujetos a estrés térmico, debido a que lo expresan alrededor de 4,5 h menos que aquellos que no están estresados. Además, la frecuencia de las montas decrece durante los meses más calurosos del año. Una probable razón para la baja expresión del celo, es el cansancio físico sufrido por el animal en estrés. Otra posible razón puede tener origen hormonal, ya que los animales estresados tienen bajos niveles circulantes de E_2 , y en algunos casos, tienen niveles altos de adrenocorticotropinas, que pueden inhibir el comportamiento causado por el estradiol.

b) El estrés calórico puede afectar la reproducción, reduciendo los porcentajes de concepción. La disminución en los porcentajes de concepción puede ser el resultado de las variaciones de temperatura y/o una reducción en el flujo sanguíneo al tracto reproductivo. Como resultado del aumento de temperatura y de la variación en el volumen de sangre que llega al útero, la probabilidad de que se produzca muerte embrionaria temprana, aumenta.

c) El estrés calórico eleva los niveles en plasma de $PGF_{2\alpha}$ en hembras bovinas productoras de carne y leche, lo que genera un efecto perjudicial en el desarrollo del embrión.

En estudios *in vivo* Sartori (2002a y 2000b), ha observado que el estrés calórico compromete la competencia del ovocito para ser fecundado y el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto (Roth *et al.*, 2001; Al-Katanani *et al.*, 2002a y 2002b; Sakatani *et al.*, 2003).

Lozano-Domínguez *et al.* (2010), encuentran que la tasa de gestación de receptoras se reduce en un 50% cuando éstas reciben un embrión producido en época cálida, (comparada con la observada en vacas que recibieron un embrión cuyo origen de producción, fue de época templada), lo que podría indicar un efecto negativo del estrés calórico sobre la viabilidad del embrión, aún cuando éste se haya desarrollado hasta el estadio de blastocisto. Este efecto adverso del estrés calórico sobre el desarrollo temprano del embrión, ha sido previamente señalado en estudios *in vivo* (Ealy *et al.*, 1993) e *in vitro* (Sakatani *et al.*, 2003; Block *et al.*, 2003 y Jousan and Hansen, 2004). Otra posibilidad pudo haber sido el efecto que tiene el estrés calórico sobre el desarrollo y la calidad del folículo y el ovocito antes de la ovulación, que reduce el desarrollo y la



supervivencia del embrión (Sartori *et al.*, 2002a y 2002b; Roth *et al.*, 2001; Al-Katanani *et al.*, 2002 y Sakatani *et al.*, 2003).

Sin embargo, no todos los autores observan cambios en la fertilidad de las hembras con relación a las diferentes épocas del año. Hasler (2001), en un estudio sobre los factores que afectan a la preñez en TE convencional, no encontró diferencias ($P > 0,05$) en los porcentajes de gestación para las diferentes estaciones: primavera 68,8% (n=2718), verano 67,7% (n=2004), otoño 67,8% (n=1907) e invierno 68,5% (n=2394). Incluso, la transferencia de embriones se está utilizando como una alternativa para incrementar la tasa de gestación de las vacas lecheras en épocas cálidas. Varios estudios realizados en vacas receptoras de embriones frescos producidos *in vitro* (Ambrose *et al.* 1999 y Al-Katanani, 2002) o de embriones recolectados de vacas superovuladas (Putney *et al.*, 1989; Drost *et al.*, 1999; Vasconcelos *et al.*, 2006 y Baruselli *et al.*, 2010), han comprobado mejores tasas de gestación en condiciones de estrés calórico, comparada con la observada en vacas que se sometían a inseminación artificial.

II.7.1.2.- Alimentación y manejo

Un importante factor que debe ser controlado de una manera efectiva en un programa de trasplante de embriones, es el asociado a la nutrición, ya que existe una influencia directa entre la nutrición y la reproducción de los bovinos.

La dieta, puede afectar el patrón de ondas de crecimiento folicular, debido a que una nutrición pobre, está asociada a bajas concentraciones de IGF-I circulante (Murphy *et al.*, 1990), reducción del diámetro del folículo dominante de todas las ondas y también, reduce el tiempo de persistencia de este folículo durante la primera onda (Rhodes *et al.*, 1995).

El desequilibrio energético produce una disminución de la función del eje hipotálamo-hipofisiario-ovárico causando alteraciones como ovarios sin estructuras que demuestren ciclicidad y anestros prolongados (Schroeder, 2005). De la misma manera, van a encontrarse disminuciones en la secreción de GnRH, inhibición del metabolismo de mineralocorticoides, inhibición del metabolismo basal, atresia folicular, escasa liberación de hormona estimulante del tiroides (TSH), disminución en la tasa de ovulación, celo silente, muerte embrionaria y anestro (Elrod and Butler, 1993).

Por otra parte, se ha podido comprobar que al administrar altos niveles de proteína cruda en la dieta de los bovinos se va a inducir la alteración en el pH en el rumen, afectando de manera directa el medio uterino, ya que al producirse esta alteración en los iones, se puede afectar la ionización de los sustratos energéticos para el embrión, poniendo en peligro su supervivencia antes del reconocimiento materno de la preñez, generando una pérdida embrionaria temprana (Baxter and Ward, 1997; Duica *et al.*, 2007).

El balance nutricional (energía, proteína, vitaminas, minerales y agua), debe ser por tanto, el adecuado a las necesidades de las hembras (tanto donantes como receptoras), si queremos optimizar los resultados de la técnica del trasplante de embriones.

De manera cotidiana se ha venido utilizando la condición corporal (CC) (sistema que clasifica a las vacas, según la apreciación visual y palpación manual de su nivel de



reservas corporales), como el mejor indicador de las reservas nutricionales de una vaca. Las escalas más difundidas se extienden entre 1 y 9 para vacas de carne (Herd and Sprott, 1986) y entre 1 y 5 para vacas lecheras (Ferguson *et al.*, 1994).

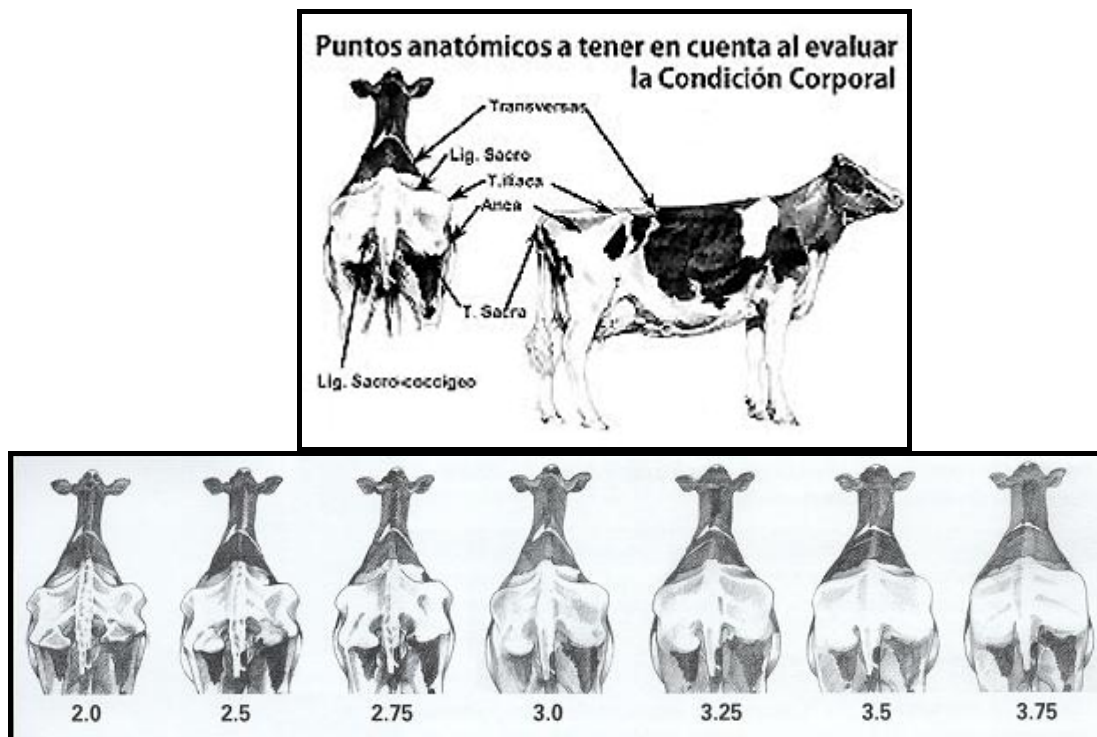


Figura 21: Puntos anatómicos a tener en cuenta para evaluar la condición corporal del ganado vacuno así como distintas imágenes de vacas que muestran diferente condición corporal

La CC ejerce una influencia marcada sobre los porcentajes de gestación, y en la técnica del TE, los mejores resultados se han obtenido cuando las hembras, tanto donantes como receptoras, presentan valores intermedios, de 2 a 3 en la escala de 1 a 5 (5 es obeso y 1 es caquéctico) (Stroud and Hasler, 2006). Estos hallazgos coinciden con los obtenidos por Flores *et al.* (2007), que al evaluar la ciclicidad por medio de radiotelemetría en ganado cruzado con Brahman (1/4 a 3/8 Brahman) de diferentes CC, compararon días abiertos y porcentaje de presentación de celos posinsincronización con implante intravaginal, encontrando unos mejores índices en los animales con CC moderado, 64% de presencia de celos para animales de baja CC contra 82% en animales de CC moderada. Al-Katanani *et al.* (2002) encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) en los porcentajes de gestación entre grupos de diferentes condiciones corporales: CC = 2,5 y $> 2,5$, para programas de inseminación a tiempo fijo (IATF), y TE, hallando porcentajes de gestación diferentes entre los grupos (15,6% y 5,5%, respectivamente).

En las diferentes explotaciones en las que trabajamos, es normal que se presenten diferencias operativas que alteren los resultados de los programas, como por ejemplo, el tipo y la cantidad de suplementación mineral que se suministra, la disponibilidad de forraje verde, la disponibilidad de forraje almacenado (tipo silo o heno), el estrés causado por malas prácticas de manejo como golpes en exceso al conducir los animales o en los corrales. Stroud and Hasler (2006), estudiaron algunos de los factores que en una explotación pueden afectar el éxito de un programa de TE; analizaron los programas de IA en vacas, en novillas y programas de TE de cuatro fincas (A, C, D y E). Encontraron diferencias significativas entre ellas ($P < 0,05$), aún cuando el mismo grupo



de técnicos realizaba los procedimientos. Estas diferencias, fueron atribuidas a factores de manejo y organización de las explotaciones. Se comprueba que existe un efecto del manejo entre las explotaciones, como las relacionadas con la experiencia del equipo de la finca en cuanto a manejo de ganado bovino, además de las dificultades de algunas instalaciones como corrales que causan estrés elevado de manejo a los animales. Los diferentes tipos de administración de las explotaciones, pueden o no proporcionar ambientes confortables, por ejemplo, la disponibilidad de sombra y agua fresca en los parques.

De la Fuente (2009), señala la importancia de no realizar cambios de manejo en los dos meses anteriores a la superovulación, ya que se debe evitar todo lo que pueda suponer un estrés para la hembra donante. Todos estos factores ejercen una presión decisiva en los resultados de un programa de TE que, sumados, son uno solo: el manejo de la finca.

Además de los factores ya nombrados, la técnica del trasplante de embriones en sí, exige manejo adicional para desarrollar los protocolos de superovulación de donantes y sincronización de celos de receptoras, que igualmente deben tener la menor cantidad posible de entradas en los corrales, para reducir al máximo el estrés causado.

II.7.2.- Factores intrínsecos relacionados con la donante

Es importante hacer una adecuada selección de la hembra donante ya que ésta interviene directamente en los resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica. Además de la superioridad genética, se deben tener en cuenta factores como raza, edad, estado nutricional, estado sanitario, estado fisiológico etc. puesto que todos ellos van a influir en el resultado obtenido en el trasplante de embriones.

II.7.2.1.- Raza

Se sabe que existen diferencias en la fisiología reproductiva de bovinos del tronco *Bos taurus* y *Bos indicus*. Se ha estudiado que las razas *Bos indicus* tienen un mayor número de folículos por cada onda folicular (Carvalho *et al.*, 2008) y a su vez, se ha obtenido un mayor número de ovocitos, después de una aspiración folicular (3 ó 4 veces mayor) (Martins *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que las razas *Bos indicus* tienen una mayor sensibilidad a las gonadotropinas exógenas que las razas *Bos taurus* (Baruselli *et al.*, 2006).



Foto 16: Vacas *Bos indicus* y *Bos taurus* (aptitud lechera y cárnica).

Para Figueriedo *et al.* (1997), Pinheiro *et al.* (1998) y Baruselli *et al.* (2007), existen diferencias en la dinámica folicular entre *Bos taurus taurus* (taurino) y *Bos taurus indicus* (cebuino), particularidad observada en el número de ondas de crecimiento



folicular por ciclo estral, capacidad de secretar LH, área del tejido luteal, diámetro folicular en el momento de la divergencia y en la ovulación. En novillas *Bos taurus indicus* (cebuínas), Rhodes *et al.* (1995), Figueiredo *et al.* (1997), Viana *et al.* (2000) y Luiz (2002), comprueban que la dinámica folicular se caracteriza por la presencia de dos ondas (33%) y tres ondas (57,1%), viendo hasta cuatro ondas por ciclo en razas Brahman, Neloré y Gyr.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que en ganado *Bos indicus* (independientemente del grado de respuesta ovárica obtenida), los resultados pueden ser alterados por las características propias del tracto genital de estas hembras, que ofrece dificultades para efectuar la recolección (Cabodevila and Torquati, 2008).

Savio *et al.* (1988), Sirois and Fortune (1988), Ginther *et al.* (1989a) y Wolfenson *et al.* (2004), encuentran que en los animales de la raza Holstein (*Bos taurus taurus*) predominan de dos a tres ondas por ciclo estral.

A su vez, dentro de razas *Bos taurus* algunas requieren mayor cantidad de FSH que otras. Por ejemplo, Chupin *et al.* (1985), sugirieron que las vacas Holstein requieren una dosis mayor de FSH que vacas de la raza Charolais.

Por otro lado, Gordon (2004) atribuye los beneficios a las razas lecheras por su docilidad, éstas están en contacto con las personas, mientras el vacuno de carne está menos acostumbrado al manejo y puede mostrarse menos dócil, siendo éste más sensible al estrés por el manejo, lo que puede influir negativamente en la respuesta al tratamiento de superovulación como donante de embriones, y en este mismo sentido, Fuentes *et al.* (2012), señala la gran variabilidad en la respuesta que suelen presentar las razas más rústicas, poco seleccionadas de *Bos taurus*, frente a las seleccionadas.

II.7.2.2.- Edad

El efecto que tiene la edad de la donante sobre la respuesta superovulatoria ha sido ampliamente estudiado en el ganado lechero. El número de embriones transferibles obtenidos en donantes cuyas edades estaban comprendidas entre 3 y 6 años resultó mayor que el que se logró en novillas y primíparas, en este sentido Vieira *et al.* (2014), encontraron que las vacas donantes tenían mayor número de embriones ($7,6 \pm 0,6$ vs. $4,6 \pm 0,4$) ($P < 0,001$) y mayor porcentaje de recuperación que las novillas (77,6% vs. 58,7%, respectivamente) ($P < 0,001$).



Foto 17: Ejemplares de novilla y vacas de raza Frisona.

Por su parte, Hanselmann (1995), efectuó un estudio retrospectivo en el que analizó la respuesta superovulatoria de 197 donantes, agrupándolas en tres categorías, hasta 5



años, de 6 a 8 años y mayores de 8 años. El promedio de embriones transferibles fue 5,2; 6 y 3,2 embriones, respectivamente.

Lerner *et al.* (1986), sostienen que existe una interacción entre la edad de la donante y la dosis de gonadotropina. Según su interpretación, cuando animales jóvenes son tratados con dosis elevadas de gonadotropina, se produce una sobreestimulación ovárica donde muchos folículos comienzan a desarrollar pero pocos, son capaces de ovular y la mayoría sufren luteinización o se atresian. El motivo sería un insuficiente aporte sanguíneo a determinados folículos debido a limitantes físicas del ovario para albergar tantos folículos en crecimiento y por otro lado, se producirían alteraciones endocrinas con excesiva producción de esteroides ováricos que interfieren en el propio desarrollo folicular y la ovulación. En su trabajo, observaron además 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 las gonadotropinas exógenas. Al haber menos folículos en crecimiento, los niveles de inhibina bajarían y habría un aumento de la FSH endógena que haría que en estos animales, en cualquier momento de su ciclo estral, sus folículos en crecimiento estuvieran en un estado de desarrollo más avanzado que aquellos folículos en 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 alta concentración de estradiol podría ser la causa de la disminución en la tasa de fecundación y en la calidad embrionaria. El aumento de las tasas de fecundación y de embriones transferibles observados por estos autores cuando incrementaron la dosis de FSH en los animales viejos, se debería a un aumento en la proporción de folículos relativamente menos maduros, que fueron capaces de ser estimulados y desarrollar rápidamente.

Malhi *et al.* (2005) también comprobó, que las células de los ovocitos y la cantidad de embriones transferibles, es menor en vacas viejas que en vacas jóvenes.

Basado en estas observaciones, resulta claro que para lograr un alto número de embriones transferibles, la dosis de gonadotropina debe ajustarse a la edad de la donante. Manteniendo una dosis de gonadotropina constante, el número de ovocitos y embriones recolectados debería aumentar con la edad en los animales jóvenes (debido a una disminución en el grado de sobrestimulación ovárica), hasta alcanzar un pico y luego disminuiría con la edad en las vacas más viejas (debido a una menor disponibilidad de folículos en crecimiento (Monniaux *et al.*, 1983).

Sin embargo, para Hasler (1992), la edad no es un factor determinante en la respuesta a la superovulación. En general, sólo encontró pequeñas diferencias en las respuestas de las vacas de entre dos y catorce años y Donaldson (1984), también observó que no hubo efecto de la edad sobre el número total de embriones recuperados hasta los nueve años de edad. Después de los nueve años de edad, se produjo una disminución en la respuesta medida en la cantidad de embriones transferibles. La disminución de la respuesta superovulatoria tal vez fue debida a una reducción en el número de folículos (Lerner *et al.*, 1986).

Por otro lado, en razas productoras de carne, se observó que con el transcurrir de los años, si bien se mantuvo el número de ovulaciones, la tasa de fecundación y la calidad



embrionaria, disminuyeron. Esto no pudo ser corregido aumentando la dosis de FSH (Mapletoft *et al.*, 1991).

II.7.2.3.- Estado nutricional

La alimentación de la donante, tanto en el período seco como en el postparto, va a ejercer una gran influencia en el intervalo parto-superovulación, en el porcentaje de vacas que responden al tratamiento y en la cantidad y calidad de los embriones obtenidos (de la Fuente, 2009).

Las hembras donantes, deben ser incluidas en un programa de nutrición balanceada antes de efectuar el proceso de superovulación, donde se debe procurar administrar forrajes que brinden al animal los nutrientes necesarios para que se cumplan las funciones reproductivas, además de la incorporación de productos que proporcionen al animal adecuados niveles energéticos en la dieta, así como suplementos vitamínicos y minerales (Gómez, 2005).

La donante, debe alcanzar el nivel óptimo de condición corporal en el último tercio de la lactación, para mantener este estado durante el período seco y llegar al parto en buen estado corporal, pero nunca gordas ni flacas, con un nivel óptimo de puntuación de 3 en la escala de 1 a 5 (de la Fuente, 2009) y Castro (2007), concreta que la condición corporal óptima para trabajar con una vaca donante y obtener buenos resultados, es en vacas de carne de 5 a 6 y en vacas de leche, de 2.5 a 3.0.

Se debe evitar el uso de animales obesos como donantes, ya que esta condición puede incidir directamente sobre la producción de los embriones (Palma, 2001).



Foto 18: Ejemplos de vacas con distintas condiciones corporales en el posparto.

Para Palma and Brem (1993), el estado nutricional de la vaca donante tiene influencia tanto en el porcentaje de ovulación y fecundación, como en la viabilidad de los embriones.

Hay que tener en cuenta, que algunos trabajos han señalado efectos positivos de la alta ingesta de alimentos en la población folicular y números de ovulaciones, otros no detectaron efectos y otros, detectaron un efecto negativo (Sartori *et al.*, 2007).



Podríamos explicar la diversidad en los resultados de estos trabajos siendo conscientes de que las vacas, si están en pobre condición corporal, una mejora en el valor nutritivo de la dieta, puede mejorar su respuesta reproductiva. Sin embargo, si las vacas están en buena condición corporal o son obesas, un aumento del nivel energético de su dieta, afecta negativamente al número de folículos presentes cuando se inicia el tratamiento con FSH, a la respuesta superovulatoria y sobre todo, a la calidad de los embriones (Sartori *et al.*, 2007)

Otra explicación a estos resultados, sería apuntar que los animales con una mayor ingesta de alimentos tienen un mayor metabolismo hepático, que conduce a una caída en las concentraciones de hormonas esteroides circulantes E₂ y P₄, las bajas concentraciones séricas de esteroides, son potencialmente causantes de poner en peligro la reproducción de las vacas lecheras (Sartori *et al.*, 2004), ya que según se ha comprobado en ovejas, pueden contribuir a fallos en la fecundación y en el desarrollo embrionario temprano (DeSouza and Murray, 1995).

Por tanto, la alimentación en el posparto debe ser equilibrada y ajustada a las necesidades fisiológicas y nivel de producción. El control de la alimentación de las donantes debe iniciarse mucho antes del inicio de la superovulación, ya que los errores cometidos incluso siete u ocho meses antes de la superovulación ejercerán una acción negativa sobre la respuesta superovulatoria (de la Fuente, 2009).

II.7.2.4.- Estado sanitario

En España, la producción de embriones debe cumplir los requisitos sanitarios recogidos en el Real Decreto 855/1992, de 10 de julio, por el que se fijan las condiciones de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones procedentes de terceros países de embriones de animales domésticos de la especie bovina y en el Real Decreto 841/2011, de 17 de junio, por el que se establecen las condiciones básicas de recogida, almacenamiento, distribución y comercialización de material genético de las especies bovina, ovina, caprina y porcina, y de los équidos, que trasponen la normativa de la UE en nuestro país.

Los requisitos generales exigidos para la donante, son los descritos en el Sector IV, Capítulo I del Manual de la IETS (International Embryo Transfer Society).

Igualmente, si se obtienen embriones para la exportación, deben además cumplir los requisitos recogidos en el Capítulo 4.7. de “Recolección y manipulación de Embriones de ganado y équidos recolectados *in vivo* del *Código Sanitario para los Animales Terrestres* 2010 © Oficina Internacional de Epizootias (OIE).

Las donantes, deben ser consideradas por tanto de forma individual y como integrantes de un rebaño y a la hora de decidir cuando superovular, deberemos estudiar y valorar aquellos factores ligados tanto al individuo como al rebaño.

Así, de acuerdo con la legislación anteriormente mencionada, las hembras donantes de embriones deben estar en explotaciones con un estatus sanitario de Oficialmente Indemnes a Tuberculosis, Oficialmente Indemne a Brucelosis, Indemne a Leucosis Enzoótica Bovina y Libre de Perineumonía. La ganadería no habrá tenido ningún caso



clínico durante el último año de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (**IBR**) y la donante no tendrá ningún proceso infeccioso en el momento de la colecta.

Con respecto a los embriones, la membrana pelúcida tiene que estar intacta, sin suciedades adheridas, se realizarán 10 lavados en medio estéril y se realizará el tratamiento con tripsina, si van destinados a la exportación (Foto 19).

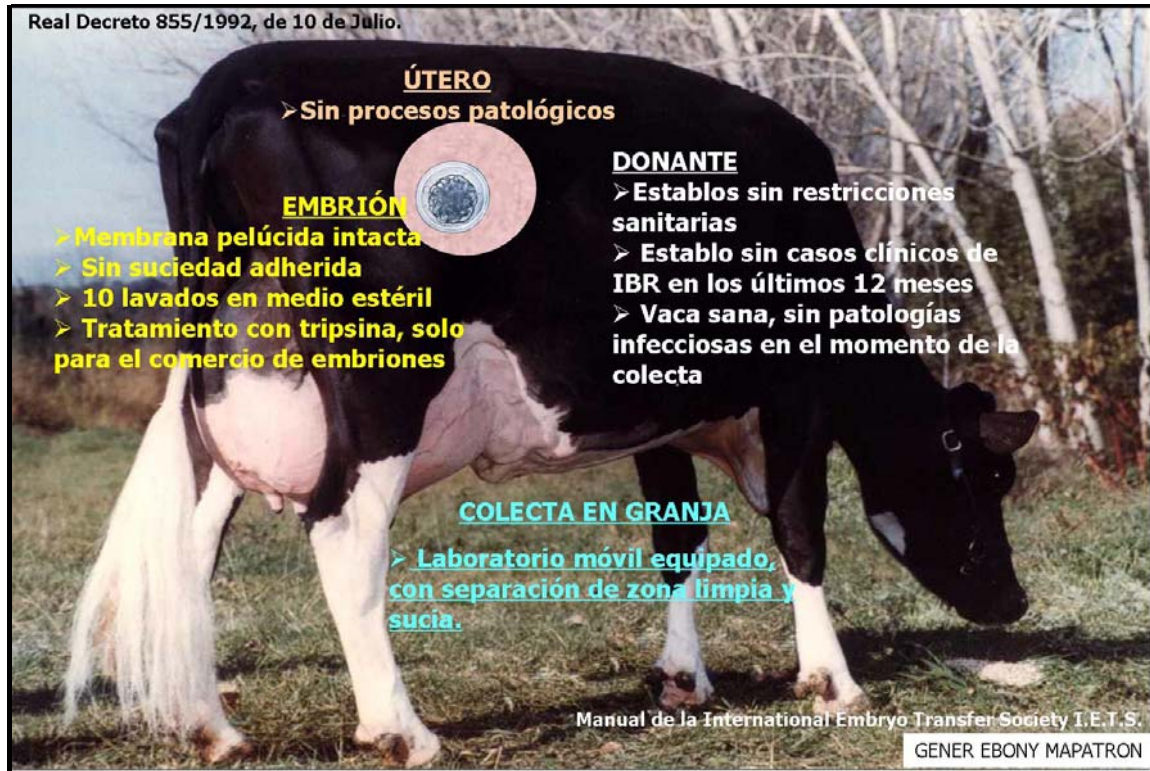


Foto 19: Aspectos sanitarios relativos al embrión, la donante y la ganadería.

II.7.2.5.- Estado fisiológico

El estado fisiológico del animal (vacas en producción o secas), conlleva un manejo distinto en el rebaño, y una problemática diferente que tendremos que valorar para decidir el cuándo y el cómo de la superovulación de la hembra donante.

En las vacas en producción, el intervalo parto-superovulación mínimo dependerá inicialmente del estado reproductivo de la donante, por lo que podremos situarlo a partir del día 60 posparto, para que se garantice una efectiva involución uterina y se muestre una buena ciclicidad reproductiva (Gonzales-Stagnaro, 2001).

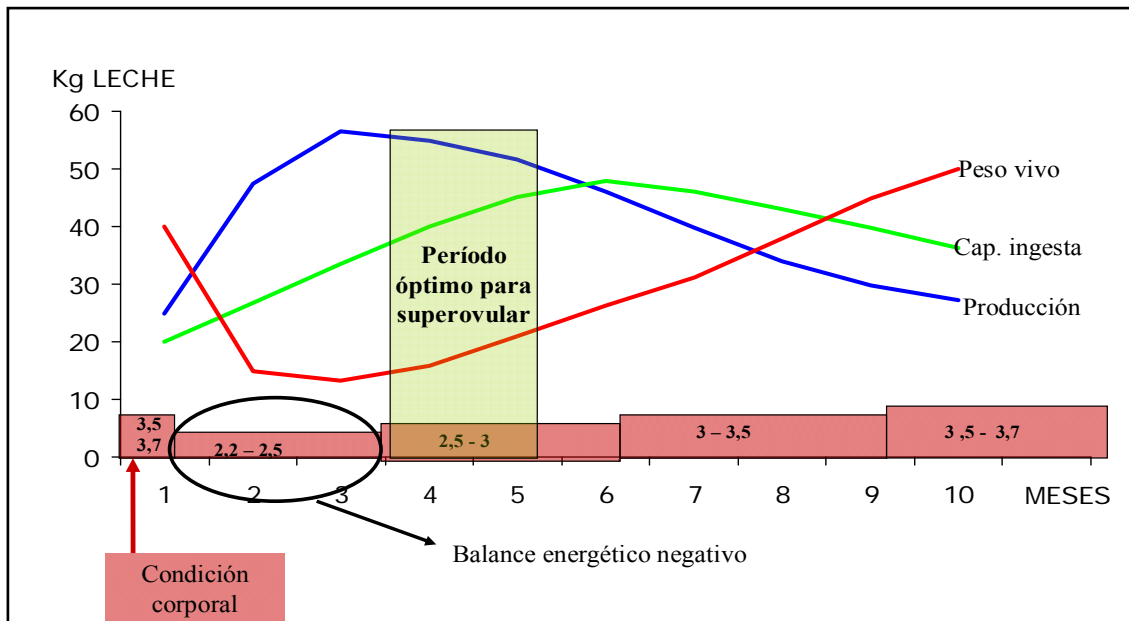


Figura 22: Evolución de la producción de leche, peso vivo, capacidad de ingestión y momento óptimo de superovulación según condición corporal (Fuentes. and de la Fuente, 2010a).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los primeros meses después del parto si hablamos de hembras de alta producción, la vaca se encuentra en una situación de balance energético negativo. En estas circunstancias los intentos de superovulación conducirán normalmente a la obtención de malos resultados, por lo que es necesario esperar a que los animales aumenten su capacidad de ingestión, recuperen peso y bajen el nivel de producción. Por lo anteriormente expuesto, podemos situar el momento óptimo para la superovulación entre los 90 y 120 días, (teniendo en cuenta que el ganadero desea generalmente dejar lo antes posible la vaca gestante), para no alargar excesivamente el intervalo entre partos (Figura 22). Es muy importante realizar un exhaustivo control del control del posparto temprano que evitará problemas o si se presentan, se podrán solucionar rápidamente.

Cuando se trata de vacas secas, se sabe que en el período seco, el principal problema es la falta de producción lo que puede llevar a un engrasamiento muchas veces excesivo, disminuyendo la efectividad del tratamiento y la calidad de los embriones obtenidos (de la Fuente, 2009).

Si hablamos de razas cárnicas, es de extrema importancia que no se encuentre con un ternero mamando de ella, para evitar el estrés de la lactancia y cuidados del ternero, logrando así un mayor rendimiento de la madre en este proceso biotecnológico (Palma, 2001).

II.7.2.6.- Tratamientos de superovulación: métodos empleados

El fundamento de la TE radica en la sobreestimulación de los ovarios de la donante para producir un elevado número de ovulaciones y así, conseguir el mayor número de embriones fecundados y desarrollados en un solo ciclo sexual de un mismo animal. Para alcanzar este fin, es necesaria la utilización de hormonas gonadotropas exógenas. Entre ellas las más utilizadas son:



- **Gonadotropinas extraídas de la hipófisis de porcinos u ovinos (pFSH y oFSH).** Cada preparado comercial tiene una diferente relación FSH/LH. Tienen una vida media corta, por lo que se necesitan aplicaciones cada 12 horas, lo cual puede suponer un problema con animales poco acostumbrados al manejo.
- **Gonadotropina de yegua preñada (eCG).** Es una glicoproteína compleja con actividad FSH y LH. Tiene una vida media aproximada de 40 horas en la vaca y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea (Murphy and Martinuk, 1991); por esta razón, normalmente se administra en una sola dosis intramuscular seguida por prostaglandina 48 h después. La prolongada vida media de la eCG, provoca algunos problemas originados por la permanente estimulación ovárica como folículos anavulatorios, perfiles endocrinos anormales (altos niveles de estrógenos) y embriones de mala calidad (Moor *et al.*, 1984).
- **Gonadotropina menopausica humana (hMG).** Tiene un alto coste y no presenta ventajas frente a la pFSH.
- **FSH y LH recombinante.** Diseñadas para su uso en medicina humana, tienen un alto coste.

La variabilidad individual en la respuesta superovulatoria a las gonadotropinas exógenas, es el factor limitante más importante que afecta a los resultados de la superovulación, de tal manera que los rangos de respuesta varían de 0 a 50 embriones, mientras que las tasas de viabilidad se sitúan entre el 0 y 100% de los embriones recogidos de una donante, independientemente de la hormona utilizada o de cualquier otra variable.

Se ha asociado la variabilidad en la respuesta ovárica con causas relacionadas con los tratamientos utilizados para inducir superovulación; las preparaciones hormonales (Monniaux *et al.*, 1983), los lotes de gonadotropinas (de la Fuente *et al.*, 1988), la duración del tratamiento (García *et al.*, 1982), el momento del tratamiento con relación al ciclo estral (Lindsell *et al.*, 1986a), la dosis total de gonadotropinas y el uso de hormonas adicionales (Pawlyshyn *et al.*, 1986).

Los preparados comerciales de gonadotropinas, contienen hormona folículo estimulante y hormona luteinizante en diferente relación FSH/LH dependiendo del preparado comercial y ésta, además, puede variar dentro de un mismo preparado comercial, según el lote (Lindsell *et al.*, 1986b; Wollen *et al.*, 1985); normalmente, el laboratorio no da información sobre la relación FSH/LH existente en los diferentes lotes que se ponen en el mercado; ésta es una importante fuente de la variabilidad que existe en el TE y que no es posible controlar.

También, hay otros factores importantes que son inherentes al animal y a su ambiente, la historia reproductiva (Hasler *et al.*, 1983), la edad (Lerner *et al.*, 1986), la estación del año (Massey and Oden, 1984), la raza (Chupin *et al.*, 1988) y el estado ovárico en el momento del tratamiento (Lindsell *et al.*, 1986a; Moor *et al.*, 1984).



Foto 20: Imagen de un ovario de vaca (día 8), superestimulado por la acción de las gonadotropinas.

Se ha demostrado que tanto la tasa ovulatoria como el número de embriones viables producidos, son caracteres relativamente inherentes a cada vaca donante, así, los animales que tienen una respuesta baja en un tratamiento, probablemente continuarán en la misma forma en los tratamientos siguientes y los animales que responden bien inicialmente, continuarán haciéndolo en esta forma (Moor *et al.*, 1984; Moor *et al.*, 1985).

La superovulación de una donante consiste en la administración de gonadotropinas exógenas, FSH/LH durante 4 días, 8 inyecciones a.m./p.m., en dosis decrecientes, con el objetivo de provocar una múltiple ovulación.

El inicio del tratamiento depende del protocolo a usar; tradicionalmente los protocolos de superovulación se comenzaban en la fase luteal media, aproximadamente entre el día 9 y el 11 después del celo (Lindsell *et al.*, 1986a; Mapletoft and Pierson, 1993). Esto se debe a que en la mayoría de las vacas, la segunda onda folicular comienza de promedio entre los días 9 y 10 del ciclo (Bó and Caccia, 2003; Ginther *et al.*, 1989b y 1989c). Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que la respuesta superovulatoria es mejor cuando los tratamientos con gonadotropinas son iniciados en el momento exacto de la emergencia de la onda folicular, en vez de 1 o 2 días más tarde (Adams *et al.*, 1994; Nasser *et al.*, 1993).

Bó *et al.* (2009), pone de manifiesto que los tratamientos convencionales tienen dos inconvenientes:

- 1) Requiere tener personal entrenado y dedicado a la detección de los celos y una respuesta 100 % efectiva a la presincronización de todas las donantes para tener el llamado “celo base o celo de referencia”.

- 2) Desde el punto de vista práctico, es imposible tener a todas las donantes al inicio de una onda folicular el día que elegimos comenzar con la aplicación de la gonadotropina.

Con el mayor conocimiento de la dinámica folicular, en la década de los 90, se desarrollaron distintos tratamientos con progestágenos y E_2 , que inducen la atresia de todos los folículos y el comienzo de una nueva onda folicular 4 días después (Bo *et al.*, 1994; 1995a y 1995b; 1996a, 1996b y 1996c). En este sentido, distintos autores demostraron que la inserción de un dispositivo vaginal de P_4 el día cero y la



administración de 5mg de E₂ intramuscular (**i.m.**) y 100 mg de P₄ i.m. junto con el estrógeno el día cero o uno, sincronizan eficazmente la onda folicular, independientemente del momento del ciclo en que la donante se encuentre, provocando la regresión de la onda folicular en curso y la emergencia de una nueva onda a los 4,3 días de media, por lo que el día 4 después de la administración de E₂ iniciamos la superovulación con FSH/LH (Adams, *et al.*, 1994; Fuentes and de la Fuente, 2000; Bó *et al.*, 2002).

Estos tratamientos, se utilizaron durante años por todo el mundo aunque no se consiguió aumentar, como se creía, el número de embriones transferibles por superovulación, así en la UE en los últimos 20 años la media de embriones transferibles por superovulación ha oscilado entre 5 y 6 (AETE 1984-2014); aunque ha disminuido el número de donantes que no responden al tratamiento. La prohibición, por la UE y posteriormente por USA, Australia, Nueva Zelanda y en estudio en otros países, del uso de progesteronas inyectables, estrógenos y sus derivados por la posibilidad de su inclusión en la cadena alimenticia humana, obligó a pensar en nuevos protocolos que sincronizaran eficazmente la onda folicular. En este sentido, un método alternativo que puede tener su aplicación práctica (ya descrito hace tiempo), consiste en eliminar, por punción guiada por ultrasonografía, todos los folículos de 5mm e inducir una nueva onda folicular, aproximadamente 1,5 días después (Bergfelt *et al.*, 1994). De esta manera, se puede comenzar la superovulación uno o dos días después de la ablación del folículo dominante o de todos los folículos presentes en el ovario.

Sin embargo, hay que reconocer que en condiciones de campo, es difícil determinar, con un solo examen ultrasonográfico, si un folículo grande es funcionalmente dominante y si los folículos pequeños están en la fase de crecimiento activo o en la de atresia. No obstante, la presencia de más de seis o siete folículos de 3-6mm. de diámetro junto a un folículo grande, 8 a 10 días después de la ovulación, da evidencias de que está comenzando una nueva onda folicular.

Un segundo inconveniente que tiene este método es que hay que contar con un equipo de ultrasonografía y personal capacitado para realizar dicho trabajo, lo que hace que esta tecnología se adapte más a centros de producción de embriones, donde todas las donantes se encuentran concentradas en un solo lugar, que a la superovulación en el campo, en las explotaciones que visitamos.

Otra alternativa, es la utilización de GnRH o pLH para inducir la ovulación del folículo dominante (Macmillan and Thatcher, 1991) y así tener el inicio de una nueva onda folicular 1,5 a 2 días después; en este sentido, los trabajos de Macmillan y Thatcher (1991) y Pursley *et al.* (1995), demostraron su eficacia al utilizar 100 µg de GnRH, comprobando que la nueva onda folicular emergente aparecía entre las 24 y 48 horas después; y se podía iniciar la superovulación a las 36 horas de la aplicación de la GnRH. Sin embargo, se ha visto que con este tratamiento, la onda es sincronizada solamente cuando el tratamiento con GnRH, provoca la ovulación del folículo dominante (Martínez *et al.*, 1999). Así, en vacas lecheras, los primeros trabajos con esta técnica mostraron tasas de ovulación del folículo dominante del 85 % después de la administración de GnRH (Pursley *et al.*, 1995) , pero otros trabajos más recientes (Colazo *et al.*, 2007) encontraron un promedio de ovulación del 62,4 % después de la administración de LH porcina y un 44,3 % cuando se trataron con GnRH (P < 0,01).



Por esta razón, los tratamientos con GnRH antes de la superestimulación, han resultado con menor respuesta superovulatoria que los tratamientos iniciados después de la aspiración folicular (Deyo *et al.*, 2001). No obstante, en un análisis retrospectivo de superovulaciones comerciales, no encontraron diferencias en el número de embriones transferibles entre donantes con CIDR[®] y superestimuladas 4 días después del tratamiento con 17- β Estradiol y 100 mg de progesterona (7,8 embriones transferibles, n=1.136) y aquellas superestimuladas 48 h después de una inyección de GnRH (7,7 embriones transferibles, n=56).



Foto 21: Visión ecográfica de un ovario estimulado con gonadotropinas inyectables.

Aunque la administración de GnRH para sincronizar la emergencia de la onda folicular parece ser demasiado variable para la ovulación, la presincronización mejora las respuestas y se puede de esta manera, superestimular a las donantes en el momento de emergencia de la primera onda folicular (en el día de la ovulación), con resultados similares a los que se obtienen utilizando estradiol (Bó *et al.*, 2009). En este sentido Hinshaw (2010), no obtiene diferencias significativas entre el uso de E₂ y cuando emplea GnRH 60 horas después de la colocación de un dispositivo de P₄. Fuentes *et al.* (2010), utilizan un tratamiento para sincronizar la onda folicular e iniciar la superovulación que incluye la aplicación de un dispositivo de P₄ junto con una PGF_{2 α} , 5 días más tarde otra PGF_{2 α} , a las 36 horas GnRH y 36 horas más tarde, se inicia el tratamiento de superovulación.

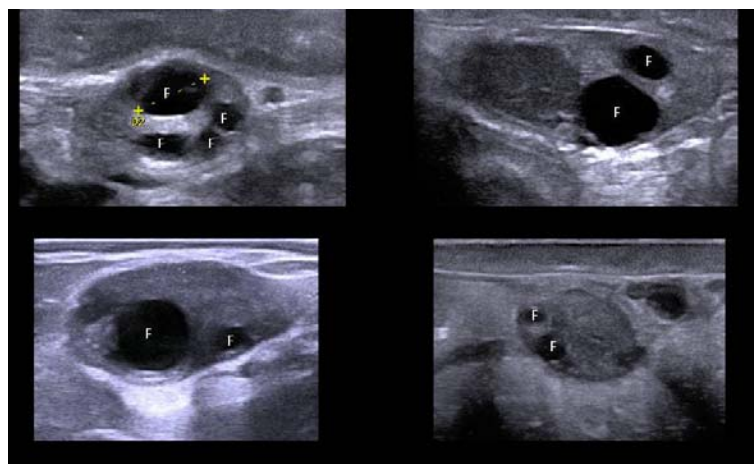


Foto 22: Imagen ecográfica de ovarios de vaca donde se pueden ver folículos anecogénicos, esféricos, de tamaños varios y en número variable.



Con respecto a los tratamientos con FSH, los trabajos han demostrado que es posible superestimular donantes con la administración de una sola inyección intramuscular de FSH diluida en una solución de liberación lenta (Bó *et al.*, 1994), lo que puede tener su aplicación práctica en hembras poco dóciles, no acostumbradas a la cercanía del hombre. También es posible la superovulación dividiendo la dosis total en dos aplicaciones (dosis partida), el primer día se inyecta i.m. el 25% de la dosis total y de forma subcutánea (s.c.) el 50%, dos días más tarde, se inyecta s.c. el otro 25% los resultados demostraron que no había diferencias significativas entre el tratamiento convencional y la dosis partida. (Fuentes and de la Fuente, 2010a y 2010b; Fuentes *et al.*, 2012).

Por último, el tratamiento superestimulador combinando FSH para reclutar los folículos en la onda y después, eCG para estimular el crecimiento final de los folículos reclutados, se presenta como una alternativa muy interesante para aumentar la respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones obtenidos por tratamiento (Bó *et al.*, 2009).

La incorporación de los protocolos que controlan la dinámica folicular y la ovulación, ofrecen la ventaja de poder programar los tratamientos de superovulación independientemente del momento del ciclo en que se encuentren las donantes, pudiendo juntar varias donantes en una misma ganadería o en un mismo día, sin la necesidad de detectar los celos de las donantes, previos a la superovulación y realizar IATF, sin depender de la pericia y exactitud en la observación de celos, tanto para iniciar la superovulación como para realizar las inseminaciones, lo que representa un gran avance en la aplicación de la técnica de TE en condiciones de campo.

II.7.2.7.- Superovulaciones continuadas de hembras donantes

El incremento del número de embriones viables obtenidos de un mismo animal, puede conseguirse mediante la realización de superovulaciones consecutivas; dependiendo del intervalo de tiempo transcurrido entre ellas y de la variabilidad individual, se puede mantener la respuesta total de embriones, aunque descienda ligeramente el número de embriones viables, lo cual hace descender significativamente la tasa de viabilidad (Hasler *et al.*, 1983; de la Fuente *et al.*, 1989).

La mayoría de los investigadores coinciden en que la respuesta superovulatoria disminuye con los tratamientos sucesivos. En algunos trabajos, el número de embriones transferibles declinó a partir del cuarto o quinto tratamiento, en otros, la declinación se produjo a partir del tercer tratamiento. Otros autores no encontraron variaciones en la respuesta superovulatoria a lo largo de diez tratamientos sucesivos. (Cabodevila and Torquati, 2008) (Tabla 4).

Tabla 4: Promedio de embriones transferibles según el intervalo entre tratamientos. (Cabodevila and Torquati, 2008).

Intervalo entre tratamientos	1° tratamiento	2° tratamiento	3° tratamiento	4° tratamiento
80 a 90 días	4	5	3	6
45 a 60 días	1	3	2	0



Es conveniente que los tratamientos estén separados por un período mínimo de 60 días, dado que este lapso es el que tardan los folículos primarios en alcanzar el estado preovulatorio. Si no se respeta este período mínimo, la respuesta superovulatoria se afecta notoriamente (Cabodevila and Torquati, 2008).

Hay que tener en cuenta, que las respuestas pobres a un primer tratamiento superovulatorio, tienen alta repetitividad. Esto fue corroborado por Lamberson y Lambeth (1986), quienes comprobaron un 64% de repetitividad para las respuestas pobres al primer tratamiento y aproximadamente un 45%, para las medias o altas (Cabodevila and Torquati 2008).

II.8.- Factores que afectan a la eficiencia del trasplante de embriones, relacionados con la receptora

El éxito de un programa de TE se mide por el número de descendientes que nacen vivos por hembra donante en un determinado lapso de tiempo (Peres *et al.* 2006), en este sentido, sin duda, uno de los factores más importantes es la óptima selección de la hembra que va a recibir un embrión en su útero, de manera tal que pueda brindarle unas condiciones adecuadas que permitan la supervivencia, nidación y desarrollo de éste.

A continuación se describirán algunos factores relacionados con la receptora que afectan el resultado del TE:

II.8.1.- Raza

Generalmente se prefiere a las hembras de razas cruzadas antes que a las puras, posiblemente porque las primeras sean más fértiles. Según algunos autores, los cruces entre las razas británicas y la Holstein son preferibles, a los cruces continentales porque éstas son más baratas, de tamaño medio y de buen potencial lechero (Cutini *et al.*, 2000).

Por otra parte, Broadbent *et al.* (1991), prefieren animales de origen lechero, (particularmente si se trata de novillas o vacas jóvenes), antes que animales de aptitud cárnica con su cría. Argumentan su elección en que dichos animales, son más dóciles y probablemente más fértiles y generalmente, ofrecen menos dificultades para llevar a cabo la transferencia.

Sin embargo, en un estudio realizado con embriones congelados y vitrificados, no se hallaron diferencias de gestación entre receptoras de razas lecheras (46,0%), de carne (43,2%) y doble propósito (43,9%) (Van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 1997).

En ganado *Bos indicus*, los resultados pueden ser alterados por las características propias del tracto genital de algunas de estas hembras que ofrece dificultades para efectuar la implantación (Cabodevila and Torquati, 2008).

II.8.2.- Edad

Existen diferencias en las opiniones de los autores consultados respecto si es mejor utilizar como receptoras novillas o vacas, mientras Broadbent *et al.* (1991), afirma que la utilización de novillas como receptoras frente a vacas, ofrece superiores porcentajes



de gestación (53% vs. 71%, respectivamente), mayor facilidad de manejo por su uniformidad y menor coste, y Hasler *et al.* (2001), encuentra mejores porcentajes de gestación en novillas respecto al obtenido en vacas en lactación, sin embargo, Callesen *et al.* (1994), Neumann *et al.* (1995) y Van Wagendonk-de Leeuw (1997), no encontraron diferencias significativas en los porcentajes de gestación en vacas o novillas como receptoras de embriones. Una explicación a este hecho se puede deber a que si bien las vacas pueden, en general, tener un porcentaje de preñez ligeramente inferior a las novillas, cuando también se tiene en cuenta la supervivencia y la viabilidad de los terneros, la tasa de éxito final es de la misma magnitud que cuando se emplean novillas (Palma and Brem, 1993; Callesen *et al.*, 1994; Callesen *et al.*, 1996). Además, el cérvix de las novillas 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 puede provocar estrés a la hembra y que actúa negativamente sobre el resultado final de gestación (Kanawaga, 1993).

Para de la Fuente (2009), como hembras receptoras, deben ser seleccionadas aquellas novillas que ciclen normalmente y hayan alcanzado un 45-55% de su peso adulto, aproximadamente a los 14 meses de edad y con unos 300-350 kg de peso vivo.

II.8.3.- Estado nutricional

La nutrición es un factor importante en el manejo de las receptoras y afecta a todos los aspectos de la reproducción. Por lo tanto, la receptora gestante no debe ser tratada como cualquier otro animal de la explotación, ya que su alimentación resulta vital para el éxito final de la transferencia (Palma and Brem, 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, en caso de utilización de vacas como hembras receptoras, guarda estrecha relación con el contenido energético de la alimentación que la receptora recibe en dicho período.

Tomando como referencia la escala 1 al 5 en CC, es necesario lograr una condición corporal 2,5 al parto para que ésta no resulte inferior a 2 en el momento de la transferencia (Broadbent, *et al.* 1991). Además, el nivel energético debe seguir siendo correcto, sin llegar al exceso y debe continuar hasta que la nidación del embrión haya finalizado, resultando determinante entre los días 21 y 45 de gestación (Sreenan and Diskin, 1987).

Mapletoft *et al.* (1986), obtuvieron mayor porcentaje de preñez con receptoras de condición corporal entre 2 y 3, que con aquellas que tenían una CC ≤ 1 ó ≥ 4 (Tabla 5) y estos hallazgos coinciden con los obtenidos por Looney *et al.* (2006), que encontró en hembras receptoras de embriones tasas de preñez entre 53% y 55%, con CC de entre 2 y 3 respectivamente, siendo inferiores para las condiciones extremas de 1 y 4 (44% y 47%, respectivamente).



Tabla 5: Efecto de la condición corporal de la receptora sobre el porcentaje de preñez después de la transferencia no quirúrgica, Mapletoft *et al.* (1986).

Condición corporal	Receptoras trasferidas	% de gestación
≤ 1	230	44 ^a
2	460	53 ^b
3	633	55 ^b
≥ 4	175	47 ^a

Valores con superíndices diferentes, muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

Así parece que el aporte energético y una condición corporal adecuada (de 2,5 a 3), son importantes factores que condicionan el éxito en la obtención de la gestación.

Las receptoras, deben estar en un estado positivo de energía y la ración en todos sus componentes (proteína, energía, minerales, vitaminas, etc.) debe ser equilibrada. En caso contrario, habrá que suplementar hasta satisfacer las necesidades de cada animal. Por ende, cualquier cambio deberá realizarse gradualmente, siendo recomendable mantener a las posibles receptoras con la misma dieta desde al menos 6 semanas antes de la transferencia y mantenerla hasta los dos meses de gestación (de la Fuente *et al.*, 2012).

II.8.4.- Estado sanitario

En el éxito de un programa de TE influyen muchos factores, pero tal vez uno de los más importantes sea la selección de las hembras receptoras; estas deben ser animales sanos desde todos los puntos de vista; no deben padecer ningún tipo de patología reproductiva, infecciosa, nutricional o de cualquier otra índole. Deben ser animales que hayan mostrado al menos dos celos con intervalos regulares. Antes de iniciar el tratamiento de sincronización, se exploraran para verificar la presencia de estructuras que demuestren ciclicidad a nivel ovárico y asegurarnos de la ausencia de cualquier tipo de patologías.

Las receptoras de embriones deben estar en explotaciones con un estatus sanitario de Oficialmente Indemnes a Tuberculosis, Oficialmente Indemne a Brucelosis, Indemne a Leucosis Enzoótica Bovina y Libre de Perineumonía. Además, es recomendable descartar la infecciones por Neosporas y estar en un programa de erradicación y control de IBR y Diarrea Vírica Bovina (**BVD**) o vacunadas.

Los factores de orden infeccioso así como las toxinas generadas por estos microorganismos, afectan de manera directa a la reproducción de la hembra bovina, ya que éstos presentan tropismo por el sistema reproductivo, generando infertilidad.

La infección causada por agentes como *Leptospira spp*, *Campylobacter foetus* y la *Trichomona foetus* pueden causar muerte embrionaria y generar problemas de repetición de servicios en las hembras infectadas. En el caso de infecciones causadas por el *Haemophilus somnus* se producen fallos en la fertilización y mortalidad embrionaria (Jiménez, 2005).

La acción de agentes patógenos como *Mycoplasma spp.* y *Ureoplasma spp.* también están asociada a desórdenes reproductivos, ya que causan infertilidad en la hembra, incluyendo mortalidad embrionaria (Vanroose, *et al.*, 2000).



Algunos agentes infecciosos tienen la capacidad de adherirse a la zona pelúcida del embrión, siendo el IBR el más importante; los restantes son, *Hemophilus sommus*, *Mycoplasma bovis*, *Ureoplasma diversum*, *Mycoplasma paratuberculosis*. La IETS recomienda el tratamiento de los embriones con tripsina, cuando vayan destinados al comercio (IETS, 2000).

II.8.5.- Tratamiento de sincronización: métodos empleados

El conocimiento de las estructuras ováricas, sus características e interrelaciones en la hembra donante y receptora de embriones, en cuanto al desarrollo folicular y la estructuración y funcionalidad del cuerpo lúteo, es fundamental para lograr ofrecer un adecuado ambiente uterino al embrión y así contribuir a mejorar la eficiencia en los programas de trasplante de embriones. (Diuca *et al.*, 2007).

Descubrimientos recientes de las funciones del cuerpo lúteo y las ondas foliculares del ciclo estral bovino, se han traducido en un renovado entusiasmo por las oportunidades de poder lograr un mejor control de la inducción a la ovulación y una más precisa sincronización del ciclo estral (Colazo and Mapletoft, 2014a y 2014b).

Aunque la técnica del trasplante de embriones está ampliamente extendida en el Mundo, con una producción de embriones en el año 2013 de 1.275.874 y 986.983 embriones transferidos (IETS 2014), la variabilidad en la respuesta del tratamiento sobre el control del estro, sigue revelándose como el factor más limitante de esta técnica reproductiva (Bó *et al.*, 2004a y 2004b), por ello, iniciamos un breve repaso a los tratamientos más utilizados en el control del estro, de la onda folicular emergente y de la ovulación en la sincronización de hembras receptoras, que se vienen aplicando en los programas de transferencia de embriones.

Podemos comenzar afirmando que todos los celos (naturales o provocados), pueden ser válidos para implantar un embrión, no existiendo diferencias significativas entre éstos, en los porcentajes de gestación. Las diferencias se encuentran en el número de receptoras aptas para la implantación, sobre todo cuando la determinación de la calidad del CL se realiza por exploración manual (aprox. 45% - 50% de rechazo), mientras que mediante ecografía el rechazo es mucho menor (aproximadamente del 30%) (Fuentes and Liébana, 2012).

II.8.5.1.- Sincronización del estro y de la ovulación. Tratamientos sin control de la onda folicular

El uso de la $PGF_{2\alpha}$ y sus análogos, han sido ampliamente empleadas de forma que han llegado a convertirse en el tratamiento más comúnmente usado con el fin de sincronizar las manifestaciones de celo del ganado bovino (Odde, 1990).

El efecto luteolítico de la $PGF_{2\alpha}$ se conoce desde 1974 (Lauderdale *et al.*, 1974), aunque el mecanismo preciso de luteólisis inducida por $PGF_{2\alpha}$ es incierto, pero podría estar relacionado con cambios del flujo sanguíneo en venas útero-ováricas, inhibición de la respuesta ovárica normal a las gonadotropinas, o estimulación de enzimas catalíticas. La $PGF_{2\alpha}$, también tiene un efecto estimulador directo sobre el músculo liso uterino causando contracción y un efecto relajante en cérvix.



Se conoce que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ causa una rápida regresión del cuerpo lúteo funcional con una rápida declinación en la producción de progesterona, pero se debe poner de manifiesto, que el cuerpo lúteo inmaduro, es insensible a los efectos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y en bovinos este período “refractario” alcanza los primeros 4-5 días después de la ovulación, y por este motivo, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ causa únicamente la regresión del CL a partir del día 5 del ciclo estral, siendo su efecto luteolítico máximo entre los días 12 y 17 (Momont and Seguin, 1984). El estado de desarrollo del folículo dominante en el momento del tratamiento condiciona la aparición del celo y la ovulación, generando una dispersión de celos entre 2 y 7 días (Kastelic and Ginther, 1991). En las receptoras que no han mostrado celo, o no se hayan utilizado para la transferencia, es posible la aplicación de una segunda $\text{PGF}_{2\alpha}$ 11 a 14 días más tarde, en este caso, alrededor del 80% de las receptoras deberían mostrar signos de celo (Odde, 1990; Bó *et al.*, 2004b).

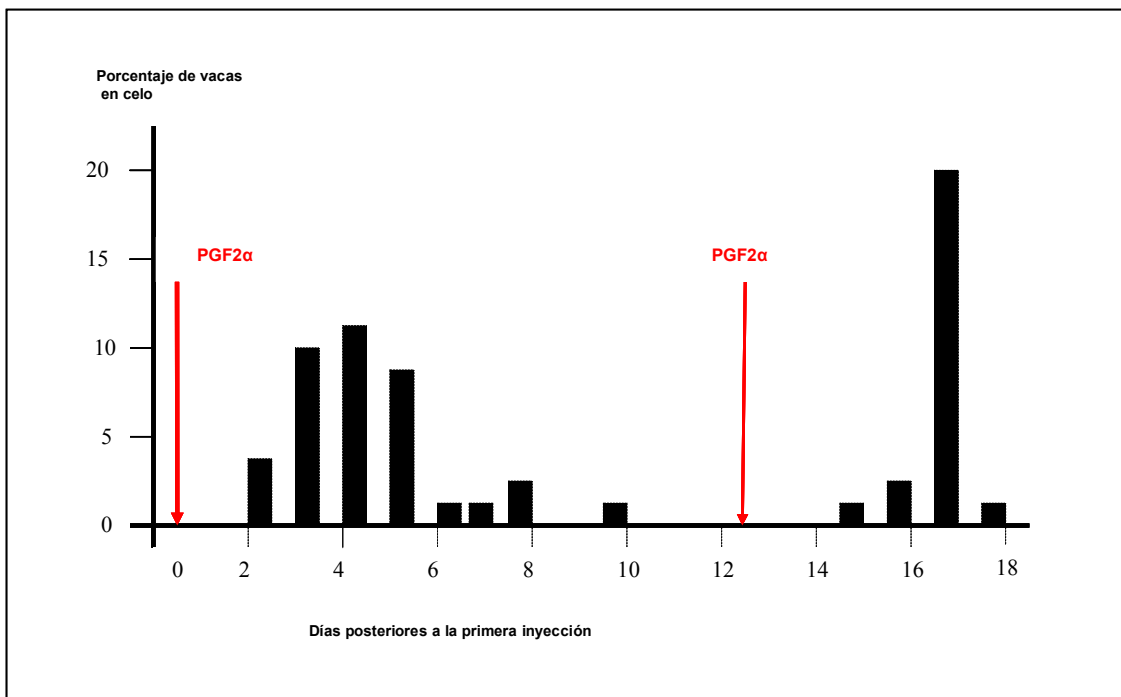


Figura 23: Distribución de los celos tras la aplicación de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ (Mialot *et al.*, 1999).

Así, si ya está presente el folículo dominante coincidiendo con la administración de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, los celos aparecen dos-tres días después; y en cambio, si la inyección se aplica durante la fase del reclutamiento, el folículo seleccionado necesita de dos a cuatro días para alcanzar la condición de dominante y el intervalo inyección-celo, resulta más largo y variable (5 a 7 días más tarde) (Kastelic and Ginther, 1991).

De este modo, el intervalo que transcurre entre la aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y el celo, es un reflejo del tiempo requerido por el folículo dominante de la nueva onda para crecer y desarrollar un estado preovulatorio. La dispersión que observamos en la aparición de los síntomas de celo con el uso de prostaglandinas, nos revela la necesidad de conseguir ejercer el control del ciclo ovárico de la hembra bovina tanto en su fase luteal como en su fase folicular, si queremos obtener mayores porcentajes de gestación en técnicas reproductivas como es la transferencia de embriones a tiempo fijo, que no requiere de la detección de celo (Bó *et al.*, 2004a).



También debemos tener en cuenta que aunque teóricamente, las dos aplicaciones de $PGF_{2\alpha}$ con un intervalo de 11-14 días son efectivas cuando hay una gran proporción de hembras ciclando y un 80% de ellas deberían ser observadas en celo, hay muchos otros factores que pueden afectar la detección de los celos (Allrich, 1993; Kastelic, 2001); muchas veces la persona encargada de la detección de celos no utiliza el tiempo adecuado observando los animales o combina la detección de celos con otras actividades. Por ejemplo, nos encontramos que si en una granja, hay muchas vacas en celo al mismo tiempo, ellas se agruparán formando el "grupo sexualmente activo" que facilita la detección de celos. No obstante, si hay solamente un animal en celo, la actividad de monta será mucho menos frecuente y su detección, se hará más difícil.

Otros factores que pueden afectar a una eficiente detección de celos incluyen la mala interpretación de los signos del mismo o el uso incorrecto de los distintos dispositivos de ayuda en la detección de celos (Kastelic, 2001).

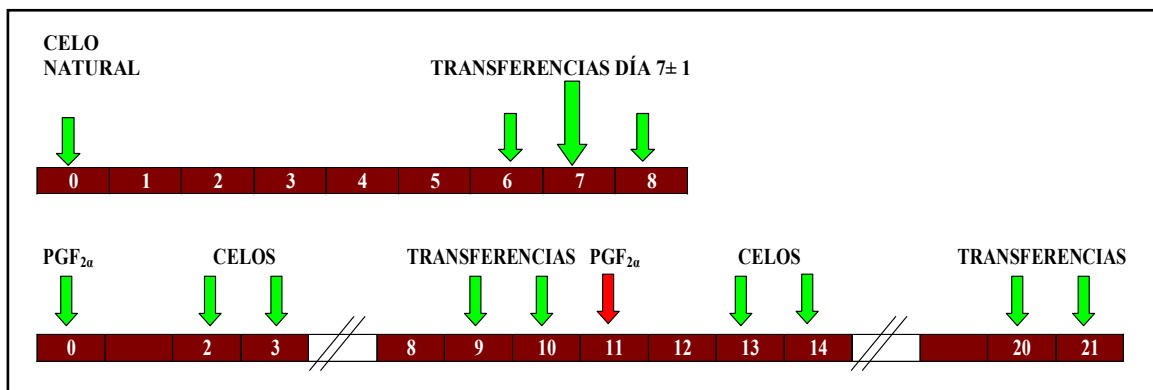


Figura 24: Métodos tradicionales de sincronización de receptoras, adaptado de (Fuentes and de la Fuente, 2007).

Como resumen, exponemos que los celos naturales y los inducidos por $PGF_{2\alpha}$ (Figura 24), fueron muy usados al inicio de la actividad en la transferencia de embriones y siguen siendo usados, pero en menor medida, debido a que impiden una buena organización del trabajo.

Así ocurre que los celos naturales aparecen de forma inesperada y el uso de prostaglandinas solas, no provoca el celo en muchos casos y tiene una gran dispersión de ellos (dependiendo del momento del ciclo en el que se encuentra la receptora cuando se le inyecta la $PGF_{2\alpha}$), además de encontrarnos con una evidente dificultad en la detección del celo cuando se realizan lotes grandes de receptoras.

Por todas estas razones, si hablamos de hembras receptoras tratadas con prostaglandinas en un programa de TE, vemos que el porcentaje real de receptoras que presentan un CL y reciben un embrión, raramente supera el 50% (Fuentes, 2000; Bó *et al.*, 2004a), y la ineficacia de este tratamiento puede ser aún peor si hablamos de hembras receptoras *Bos indicus* o sus cruces, explotadas en condiciones extensivas de pasto.



II.8.5.2.- Tratamientos para controlar la onda folicular emergente y o sincronizar la ovulación

La variabilidad en la respuesta a los tratamientos con prostaglandina $PGF_{2\alpha}$ en hembras bovinas y la dificultad en la detección de celos han limitado la aplicación a gran escala de la transferencia de embriones, promoviendo la necesidad de tratamientos que controlen el desarrollo folicular y la ovulación (Bó *et al.*, 2004b).

Hay muchos tratamientos posibles para sincronizar el desarrollo folicular y muchas investigaciones han centrado su atención en suprimir el efecto del folículo dominante (física u hormonalmente), con el fin de permitir la emergencia de una nueva onda folicular en el momento más conveniente para que el tratamiento sea efectivo (Bó *et al.*, 1995b).

II.8.5.2.1.-Procedimientos físicos: ablación del folículo dominante

Entre los métodos físicos, la eliminación de los folículos puede ser realizada por la punción guiada por ultrasonido, a través de la fosa paralumbar o por vía transvaginal. Se ha podido comprobar que la ablación del FD mediante ultrasonografía guiada es una práctica válida para conseguir el control de la onda folicular emergente y sincronizar la ovulación (Foto 23).

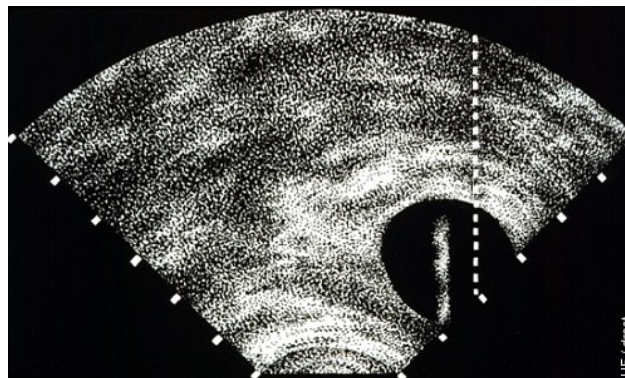


Foto 23: Ablación del folículo dominante por ecografía. Se utiliza un transductor vaginal con un escáner sectorial. La pantalla está equipada con una línea de trayectoria o de blanco para la aguja de aspiración. El folículo es alineado con la línea punteada después de lo cual, la aguja de aspiración es avanzada hasta que la punta se torne visible dentro del folículo (Drost, 1992).

II.8.5.2.2.-Métodos farmacológicos

Con la posibilidad del control farmacológico de la onda folicular emergente, se han descrito numerosos tratamientos de sincronización de receptoras, algunos en programas de TETF sin necesidad de detección de celos, aspecto éste importante cuando se sincronizan lotes grandes de receptoras.

II.8.5.2.2.1.-Utilización de GnRH y PGF: protocolo OVSYNCH

La utilización de GnRH ha sido un tratamiento hormonal muy popular de control del desarrollo folicular en los últimos tiempos (Bó *et al.*, 2004b). Se ha demostrado que la GnRH o sus análogos, inducirán la ovulación del folículo dominante presente en el momento del tratamiento (Macmillan and Thatcher, 1991), y se han desarrollado



protocolos que utilizan GnRH y PGF para inseminación artificial a tiempo fijo en ganado de carne o leche (Geary *et al.*, 1998; Pursley *et al.*, 1995; Pursley *et al.*, 1997; Thatcher *et al.*, 2001a). Este protocolo, es conocido con el nombre de Ovsynch (Pursley *et al.*, 1995) consiste en una inyección de GnRH, seguida 7 días más tarde, por una inyección de PGF_{2α} y una segunda inyección de GnRH 48 h después de la PGF_{2α} e IATF 15 a 24 h después.

La primera inyección de GnRH trata de unificar el crecimiento folicular en los ovarios de las vacas tratadas, llevándolo hasta la formación de los correspondientes CL, (de cuya regresión se va a encargar la PGF_{2α}) y tras la cual, la segunda inyección de GnRH propicia la aparición del pico preovulatorio de LH, que en un 85% aproximado de las vacas tratadas, conduce a la ovulación a las 24-32 horas (Thatcher *et al.*, 2001a) (Figura 25).

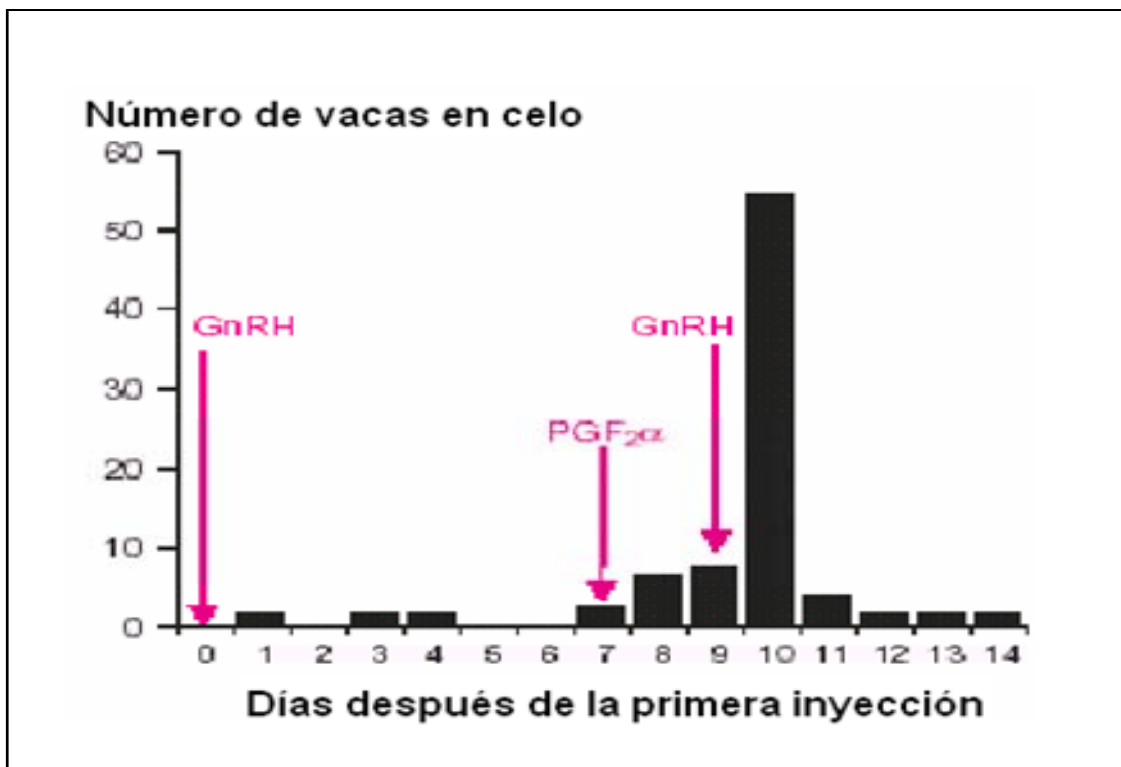


Figura 25: Distribución de los celos tras la aplicación del método Ovsynch [GnRH (PGF_{2α}) GnRH] (Mialot *et al.*, 1999).

El objetivo de la primera inyección de GnRH, es inducir la liberación de LH, dando lugar a la ovulación del folículo dominante y la emergencia de una nueva onda folicular 2 días después (Martínez *et al.*, 1999). La administración de PGF 7 días después, induce la lisis del CL y la segunda inyección de GnRH, induce la liberación de LH que sincroniza la ovulación (Pursley *et al.*, 1995).

Los protocolos Ovsynch también han sido utilizados para sincronizar la ovulación en receptoras que recibieron embriones producidos *in vivo* (Baruselli *et al.*, 2000a y 2000b; Hinshaw, 1999; Zanenga *et al.*, 2000); los resultados de estos estudios indican que la tasa final de preñez fue mayor en las receptoras tratadas con el protocolo Ovsynch y se debió principalmente a que un mayor número de receptoras en este grupo recibió embriones debido a que el protocolo Ovsynch no dependió de la detección de celos, lo que le convierte en método de elección a utilizar en programas de TETF.

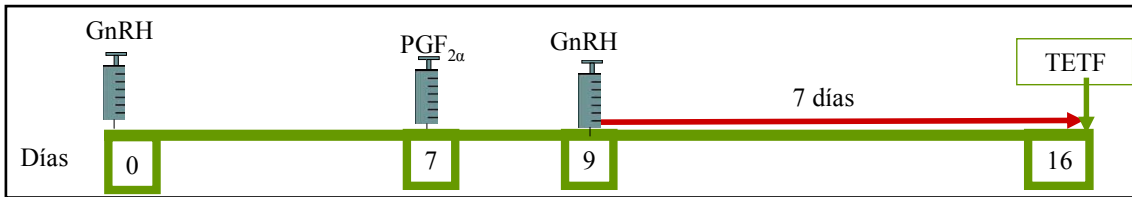


Figura 26: Protocolo Ovsynch para TETF.

Sin embargo se ha demostrado que el protocolo Ovsynch es más eficaz en vacas que en novillas (Pursley *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2002) y esto puede ser debido, según se propone en el estudio de Martínez *et al.* (1999), a que la GnRH no siempre provoca la ovulación o luteinización del folículo dominante en novillas y por tanto, no provoca una nueva onda de crecimiento folicular. Además se ha observado, que algunas de las novillas tratadas con el protocolo Ovsynch, mostraban signos de celo antes de la segunda inyección de GnRH y es por ello que para prevenir que se produzcan estas ovulaciones tempranas, se ha asociado a este tratamiento la administración de progestágenos a través de dispositivos intravaginales de esta hormona a insertar el día 0 del protocolo después de inyectar la GnRH, y que se extrae el mismo día de aplicar la inyección de la $PGF_{2\alpha}$. En este sentido, este método está también adaptado para novillas bajo la modalidad denominada CIDR-Co-Synch + 56 h. ITF (Figura 27) y se revela como de elección en el manejo reproductivo de hembras en la explotaciones de producción láctea (Domínguez *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2012).

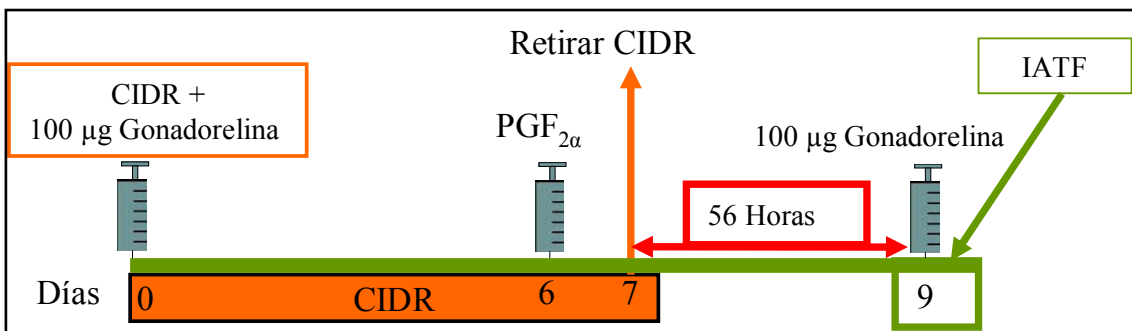


Figura 27: Protocolo de sincronización combinado CIDR-Co-Synch + 56 h ITF, adaptado para novillas. (Domínguez *et al.*, 2008).

El tratamiento Ovsynch + P_4 consiste en la inserción de un dispositivo intravaginal de P_4 y una inyección de GnRH en el día 0, seguido de $PGF_{2\alpha}$ en el día 7 y una segunda inyección de GnRH en el día 9, sin necesidad de detección de celos; el día 16 se realiza la TETF a todas las receptoras que tengan un CL. (Bó *et al.*, 2004a) (Figura 28).

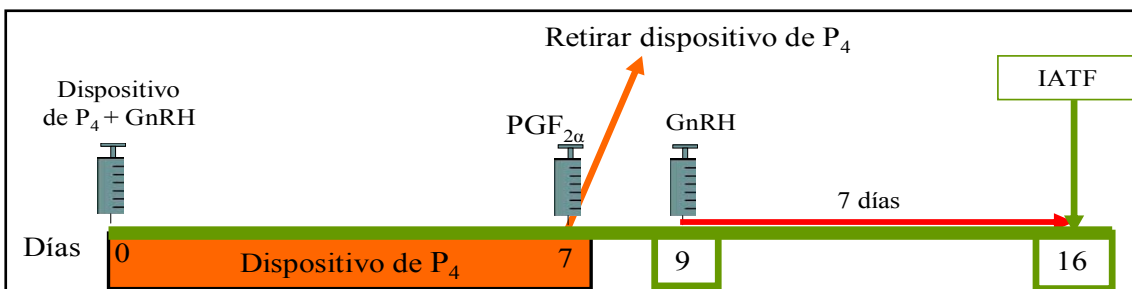


Figura 28: Protocolo de tratamiento para TETF programa Ovsynch + P_4 .



Fuentes and Liebana (2012), ensayan dos protocolos de sincronización en receptoras de embriones empleando el método Ovsynch tradicional más un dispositivo intravaginal de progesterona durante 10 ó 12 días desde su colocación el día 0 del ciclo, añadiendo que este último tratamiento (12 días), es posible usarlo sin la primera GnRH y sin detección de celos. Se obtiene un porcentaje de receptoras aptas superior al 80%; además, el 92% de las receptoras aptas presentan CL superior a 2 cm, con una media de 2,4 cm. y porcentajes medios de gestación del 53,8% (Figura 29).

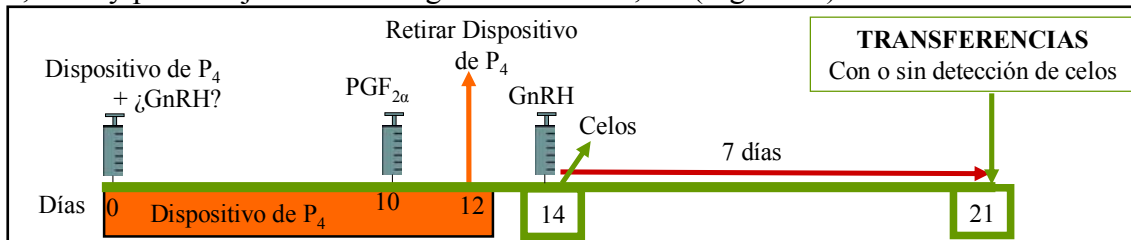


Figura 29: Método Ovsynch y variable con dispositivo intravaginal de P₄ de 12 días (Fuentes and Liébana, 2012).

En resumen, los resultados de estos estudios indican que los porcentajes de gestación que se han conseguido por este método son aceptables cuando se transfieren embriones a hembras cíclicas bovinas sin la necesidad de la detección del estro, haciendo posible la transferencia del embrión a tiempo fijo, sin detección del estro (TETF), con la ventaja que esto supone en la aplicación de esta técnica en nuestras explotaciones.

II.8.5.2.2.2.- Progestágenos / Progesterona

Existen otros métodos y variantes en la forma de ejecutar programas de inducción y sincronización del celo en el ganado vacuno, los basados en la aplicación de hormonas de acción progestérgica (métodos de bloqueo hipotálamo - hipofisario) (Domínguez, 2008; Domínguez *et al.*, 2012).

El nombre genérico de progestágenos, se le da a un grupo de compuestos que son similares a la progesterona. Estos compuestos están en el mercado desde hace varios años, inclusive desde antes que se comenzara la utilización masiva de PGF_{2α} para sincronización de celos. Dentro de estos compuestos, podemos citar los progestágenos de administración oral, como el Acetato de Melengestrol (**MGA**), los implantes subcutáneos de Norgestomet como el Crestar® y los dispositivos intravaginales con progesterona como el CIDR® (*Controlled internal Drug Release*), el DIV-B® y el PRID® (Bó *et al.*, 1995b).

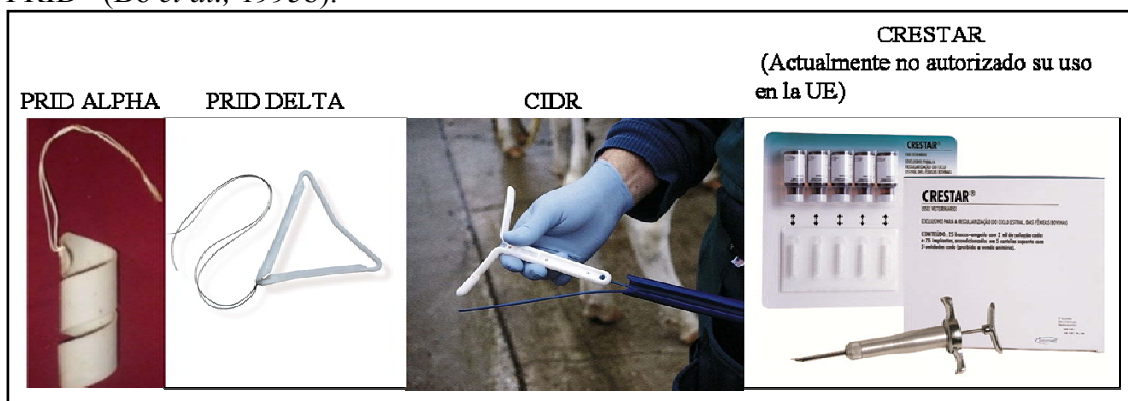


Foto24: Implantes y dispositivos utilizados en la UE para la aplicación de progestágenos y progesterona.



Sincronizar el ciclo estral de la hembra bovina con la ayuda de la progestágenos, es un medio que trata de simular la fase lútea del ciclo estral, prolongándola (Gordon, 1999). El beneficio de este sistema de control del ciclo estral, es que no se necesita que el animal presente un cuerpo lúteo funcional. Al encontrarse niveles de P₄ exógena en sangre, va a generarse un bloqueo hormonal debido a que éste simula la presencia de un cuerpo lúteo; pero es importante contar con un sistema en el que los niveles de P₄ permanezcan por un espacio de tiempo determinado en el cuerpo del animal, como los anteriormente nombrados implantes subcutáneos y dispositivos intravaginales, (Barreto and MacManus, 2002; Gómez, 2005).

En cuanto a la variante de tratamientos con progesterona mediante dispositivos intravaginales liberadores de P₄ (**DIV**); podemos decir que han sido tradicionalmente usados y se basan en la inserción del DIV en cualquier momento del ciclo estral, dejándolo un tiempo de permanencia variable y aplicando PGF_{2 α} en un momento próximo a la retirada del dispositivo. Los métodos más convencionales, incluyen la permanencia del dispositivo durante 7 a 12 días con aplicación de la PGF_{2 α} un día o dos antes de la retirada o bien al mismo tiempo, con el fin de simplificar la aplicación del protocolo.

Este tipo de métodos mejoran la eficiencia de la sincronización respecto al uso de la P₄ únicamente. Por un lado, previenen de ovulaciones tempranas en aquellos casos en que el CL regrese antes de lo esperado de forma espontánea y promueven que el folículo preovulatorio se encuentre en un estado de desarrollo suficiente cuando se aplica la PGF_{2 α} .

Estudios que se han dedicado a evaluar distintos protocolos de progestágenos/progesterona han mostrado que los tratamientos, si eran suficientemente largos, permitían la normal regresión del CL (por ejemplo ≥ 14 días), pudiendo ser capaces de inducir la sincronización del estro. Pero de cualquier forma, se ha visto que estos tratamientos prolongados con progestágenos/progesterona, podían provocar el desarrollo de folículos dominantes persistentes (Custer *et al.*, 1994; Kinder *et al.*, 1996; Savio *et al.*, 1993; Stock and Fortune, 1993) y baja fertilidad atribuida a la maduración espontánea de los ovocitos en el interior del folículo dominante persistente (Wiltbank *et al.*, 1965; Roche, 1974).

En principio se pensó, que los folículos persistentes no afectaban a la calidad del CL ni a los porcentajes de gestación en hembras bovinas receptoras de embriones (Wehrman *et al.*, 1997), sin embargo, estudios recientes han demostrado que un cuerpo lúteo de gran tamaño derivado de un folículo persistente, decrece los porcentajes de gestación en receptoras de embriones (Mantovani *et al.*, 2004).

Martínez Bello (2012), mantiene que el tratamiento de sincronización de receptoras con dispositivos intravaginales de P₄ durante 7 u 8 días y la aplicación de PGF_{2 α} 24 horas antes de su retirada, consigue aumentar la sincronización del grupo de receptoras (aquellas con mayor desarrollo folicular, esperan a las que van más retrasadas), y presenta una ventaja adicional, ya que este tipo de sincronización con un intervalo de 15 a 17 días, permite preparar en el mismo día las donantes y receptoras de una misma ganadería, con la aplicación práctica que eso conlleva.



II.8.5.2.2.3.- Tratamientos de progesterona, estradiol, GnRH y PGF_{2α}.

El uso de dispositivos de progesterona intravaginal al día cero, junto con la aplicación de benzoato de estradiol (B₂), va a producir un control del desarrollo folicular, ya que al aumentarse los niveles de estradiol, se estimula la secreción de inhibina, que genera un déficit de los niveles de folistatina, lo cual deriva en una disminución de la acción de FSH (Bó *et al.*, 2002).

Al aplicar el dispositivo de liberación de P₄ junto con una dosis de estradiol, se genera una retroalimentación negativa para la liberación de GnRH a nivel de hipotálamo, suprimiendo el desarrollo de los folículos presentes en el ovario. Como la vida media del estradiol exógeno es de aproximadamente 4 días, el día 4,3 de media, caen los niveles de éste, haciendo que se produzca una liberación de GnRH en el hipotálamo, la cual va a la hipófisis liberando FSH y LH, permitiendo a su vez que se inicie una nueva onda de crecimiento folicular (Bó *et al.*, 1995a y 1995b; Bó *et al.*, 2002; Tribulo, 2002).

El esquema práctico de esta propuesta suele consistir en la inserción de un dispositivo vaginal de progestágeno/progesterona y la administración de estradiol y progestágenos/progesterona en el día 0 (para sincronizar emergencia de la onda folicular y evitar el desarrollo de folículos persistentes), PGF_{2α} en el momento de la extracción del dispositivo entre los días 7 al 10 (para asegurar luteólisis) y la posterior aplicación de una dosis más baja de estradiol 24 h más tarde (Cutaia *et al.*, 2001) o GnRH/LH 48 a 54 h más tarde, para sincronizar la ovulación.

De esta manera, combinando la regulación de la fase folicular con la de la fase luteal, es posible predecir el surgimiento de una nueva onda de desarrollo folicular (Twagiramungu *et al.*, 1995; Bó *et al.*, 1996b).

Las ventajas del tratamiento para la sincronización del celo por medio de la asociación del dispositivo de liberación lenta de P₄, estradiol, prostaglandina y GnRH, se ponen de manifiesto por medio de trabajos realizados por Bó *et al.* (2004a), en el que a un grupo de hembras bovinas, (n=34), se les sincronizó el estro con el tratamiento descrito anteriormente, el cual fue comparado con una sincronización efectuada con dos inyecciones de PGF_{2α}. Los resultados tras la aplicación de los tratamientos demostraron que el 75% de las hembras sincronizadas con el tratamiento P₄, estradiol, PGF_{2α} y GnRH, presentaron una ovulación efectiva 72 a 84 horas después del tratamiento, mientras que en el tratamiento con prostaglandinas, solo el 40% de las hembras sincronizadas ovularon en el mismo espacio de tiempo, encontrándose diferencias significativas entre los dos tratamientos (P< 0,05).

La alternativa que mejores resultados ha demostrado para realizar un correcto control del ciclo estral y de la ovulación resultó ser el tratamiento con el CIDR-B más E₂, PGF_{2α} y una aplicación de GnRH, que obtuvo un porcentaje de gestación del 77%. Este fue comparado con la aplicación del CIDR-B más una aplicación de GnRH, el cual presentó un porcentaje de preñez del 42% (P<0.05). Por este motivo, actualmente se presentan óptimos resultados en el control del ciclo estral mediante aplicación de estas terapias hormonales en las hembras bovinas tratadas con estos dispositivos de liberación de P₄ (Baruselli *et al.*, 2001; Sakase *et al.*, 2007).



Se han diseñado una serie de experimentos para evaluar la posibilidad de aplicar los protocolos de progesterona y estradiol en receptoras de embriones sin detección de celo, en un experimento (Tríbulo *et al.*, 2000), en el que se comparaba un grupo de vacas sincronizada con PGF_{2α} frente a otro grupo de vacas que recibieron dispositivo de liberación lenta de P₄, estradiol, prostaglandina y GnRH, los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de gestación de los dos tratamientos PGF_{2α} (32%) vs. CIDR-B, (37%) ($P > 0.6$), estos resultados confirman que el uso de progesterona/progestágenos, estradiol, PGF_{2α} y GnRH, es adecuado en la sincronización de la ovulación, eliminando la necesidad de la detección de celos en grupos de receptoras de embriones en TETF.

II.8.5.2.2.4.- Utilización de eCG y hCG en el tratamiento de sincronización de receptoras con dispositivos de progesterona

Adicionalmente a los anteriores protocolos utilizados para el control del ciclo estral en las hembras receptoras de embriones para la técnica de TE, se están empleando en estos protocolos el uso de hormonas para favorecer el desarrollo folicular, así como la luteinización que ocurre una vez producida la ovulación; por este motivo, se ha vinculado el uso de hormonas como la gonadotropina coriónica equina en favor del incremento de la eficiencia tras la aplicación de la TE.

La gonadotropina coriónica equina es aplicada buscando favorecer el crecimiento folicular durante el ciclo sincronizado (Baruselli *et al.*, 2005a), así como el proceso de especialización de las células foliculares durante la luteinización, una vez producida la ovulación (Helmer and Brit, 1986). Lo anterior, va a influenciar la formación y consolidación de un cuerpo lúteo funcional, que genere unas concentraciones plasmáticas de progesterona que permitan el establecimiento de un medio uterino favorable para el desarrollo, implantación embrionaria y mantenimiento de la gestación (Niswender *et al.*, 1994; Everton and Baruselli, 2003; Madureira *et al.*, 2004) La gonadotropina coriónica equina, es una hormona glicoproteína, sintetizada y liberada en los cálices endometriales en la hembra equina gestante entre los días 40 a 130 (Bousfield and Butnev, 2001). Esta hormona presenta tropismo por los receptores foliculares de las hormonas foliculoestimulante y luteinizante, presentes en el folículo, así como por los receptores en las células del cuerpo lúteo, para la hormona luteinizante; de esta manera se va a favorecer el incremento en la síntesis de RNA mensajero (**mRNA**) que codifica para receptores de hormonas gonadotrópicas en estas células, permitiendo el aumento de la densidad de este tipo de receptores; lo anterior está asociado a los fenómenos de dominancia folicular, preparación para la ovulación y especialización celular para el desarrollo del cuerpo lúteo (Murphy, 1991; Sartori *et al.*, 2001; Baruselli *et al.*, 2003a).

Por lo tanto, con la aplicación de eCG durante el día cinco, se busca favorecer el desarrollo folicular, ya que esta hormona interviene en la síntesis de mRNA que codifica los receptores de hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) a nivel folicular, permitiendo que el folículo dominante mantenga su desarrollo (Evans and Fortune, 1997). Adicionalmente, a nivel de las células foliculares, se produce el aumento en la síntesis para la expresión de receptores de hormona luteinizante y mediante este mecanismo se inicia el proceso de dominancia folicular, la cual es influenciada por la acción de las hormonas LH y FSH (Sartori *et al.*, 2001).



Fuentes and de la Fuente (1997), ya propusieron que otra alternativa para incrementar los niveles circulantes de P_4 en receptoras de embriones es la inducción de ovulaciones múltiples mediante la utilización de eCG durante el tratamiento de sincronización de las novillas receptoras, llamado por los autores “método RESET”, que conseguía una moderada superovulación de la receptora para obtener varios cuerpos lúteos que les permitiera:

- Aumentar los niveles en plasma de P_4 que pueden mejorar la fertilidad.
- No depender de la detección de celos para la selección de las receptoras.
- Poder realizar lotes grandes de receptoras, con una buena sincronización.
- Facilitar la selección y aumentar el número de receptoras aptas para la transferencia.

Fuentes and de la Fuente (1997), presentaron en su experimento novillas Holstein que fueron divididas en cuatro grupos: el primer grupo fue formado por novillas a las que se les observó un celo natural (CN) (n=52) y que fueron transferidas 7 días después de la detección del celo (Control). El resto de los animales fueron sincronizados, las novillas del Grupo PGF (n=58), recibieron una dosis única de 500 μ g de cloprostenol i.m. (Estrumate[®]). Las novillas del Grupo PRID[®] (n=54), recibieron en el día 0 un PRID[®] (CEVA, 1,55 g de P_4 y una cápsula con 10 mg de B_2) y cloprostenol cuando se retiró el dispositivo en el día 10. Las novillas del Grupo PRID[®]+eCG (n=29), recibieron, el día de inicio del tratamiento, un PRID[®] (sin la cápsula) junto con 5 mg de E_2 y 100 mg de P_4 i.m., cuatro días más tarde 1.000 U.I. de eCG i.m.; cloprostenol en el día 6 por la mañana y por la tarde, se retiraron los dispositivos; el día 8 las receptoras están en celo y por la tarde se inyecta GnRH y el día 15 se realizan las transferencias, con o sin detección de celos (Figura30).

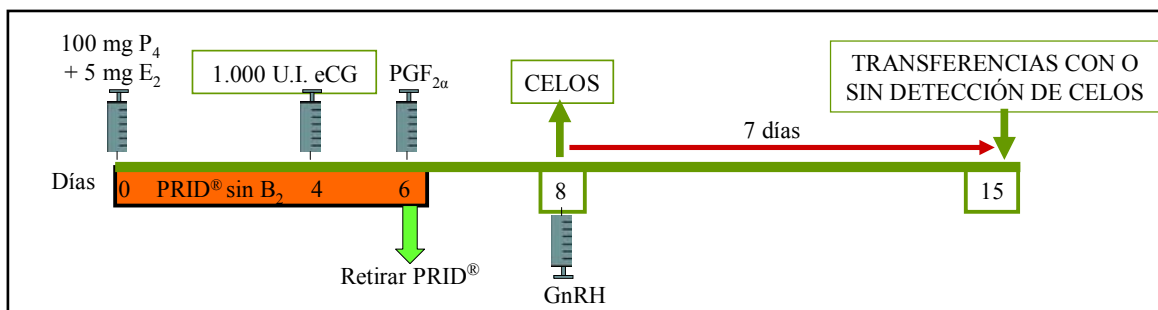


Figura 30: Método “RESET” de sincronización de receptoras (Fuentes and de la Fuente, 1997).

En este experimento, se detectó celo en todos los grupos y las novillas fueron transferidas a los 7 días de la observación de los celos. Como puede observarse en la Tabla 6, el tratamiento con PRID[®]+eCG, produjo un incremento en el número de receptoras transferidas y aumentó el porcentaje final de preñez (preñadas/tratadas).



Tabla 6: Porcentajes de novillas seleccionadas como receptoras de embriones y porcentaje de gestación, utilizando receptoras de embriones transferidas a los 7 días de la observación de celos naturales o inducidos por diferentes tratamientos de sincronización. Adaptado de Fuentes and de la Fuente (1997).

	Control	PGF _{2α}	PRID	PRID+eCG	Valor P
Transferidas/Tratadas	26/52 (50,0%) ^a	26/58 (44,8%) ^a	26/54 (48,9%) ^a	26/29 (89,7%) ^b	0,0001
Gestantes/Transferidas	15/26 (57,7%)	11/26 (42,3%)	12/26 (46,1%)	17/26 (65,3%)	0,1
Gestantes/Tratadas	15/52 (28,8%) ^a	11/58 (18,9%) ^a	12/54 (22,2%) ^a	17/29 (58,6%) ^b	0,008

En filas superíndices diferentes indican diferencias significativas.

En este experimento también se observó que el tratamiento con eCG aumentó significativamente el número de CL en los ovarios de las novillas, que presentaron entre 2 y 5 CL en cada ovario en el momento de la transferencia.

Los resultados de estos estudios y de los posteriores realizados por diferentes autores, con pequeñas variaciones (en el estrógeno usado y en la dosis de eCG), corroboraron este planteamiento, (Baruselli *et al.*, 2001; Tribulo *et al.*, 2002; Looney *et al.*, 2010), demostraron que estos tratamientos fueron eficaces para sincronizar la ovulación en receptoras de embriones y confirman que los dispositivos con P₄, combinados con estrógenos y eCG, pueden ser utilizados en transferencia de embriones a tiempo fijo sin la necesidad de la detección de celos. Baruselli *et al.* (2001), utilizó B₂ y una dosis de 800 U.I. de eCG en novillas mestizas *Bos taurus* x *Bos indicus*; obtuvo diferencias significativas entre el grupo tratado con eCG y el grupo control, para el número de CL (P<0,01); para las concentraciones de P₄ (P<0,05); para el porcentaje de novillas con CL mayores de 13mm (P<0,01); para la eficiencia del tratamiento en las gestantes sobre las tratadas (P<0,05); y para los porcentajes de gestación, gestantes sobre transferidas (P<0,01). Tribulo *et al.* (2002), utilizó B₂ en vacas mestizas de carne y una dosis de 400 U.I. de eCG; el grupo control tiene el mismo tratamiento pero sin eCG; no obtuvo diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con eCG para las transferidas sobre las tratadas, pero sí obtiene diferencias significativas entre las gestantes sobre las tratadas y entre las gestantes sobre las transferidas. Looney *et al.* (2010), utilizó E₂ y una dosis de 400 U.I. de eCG en vacas mestizas *Bos taurus* x *Bos indicus*, obtiene diferencias significativas en las transferidas sobre las tratadas y al igual que nosotros, no obtiene diferencias significativas en los porcentajes de gestación, gestantes sobre transferidas.

Posteriormente, también se han planteado estudios cuyo objetivo ha sido evaluar otra hormona disponible en el mercado para sincronizar la ovulación en receptoras de embriones como es la gonadotropina coriónica humana (**hCG**) (Moreno *et al.*, 2003), y se comparó el porcentaje de gestación en receptoras de embriones tratadas con dispositivos vaginales de P₄ y B₂ o hCG, demostrando los resultados que su uso es válido también para sincronizar la ovulación en hembras bovinas receptoras de embriones.

Sin embargo, desde octubre de 2006 el uso de estrógenos ha sido restringido en países de la UE, debido a cuestiones políticas y de opinión pública ya que hay preocupación de los efectos que pudieran producir los estrógenos en la cadena alimenticia del ser humano (Lane *et al.*, 2008), lo cual deja a muchos profesionales que realizamos transferencia de embriones en un serio dilema y con la necesidad de buscar



protocolos alternativos que sean prácticos, efectivos y que no requieran el uso de estrógenos, tal como hemos visto en el apartado dedicado a tratamientos de superovulación.

II.8.6.- Calidad del cuerpo lúteo y porcentajes de gestación

Muchos de los autores consultados, consideran que al presentarse un inadecuado control del ciclo estral en la hembra y un pobre desarrollo folicular, se va a producir consecuentemente un bajo desarrollo del cuerpo lúteo (Kastelic, *et al.*, 1990; Vasconcelos *et al.*, 2001; Sartori *et al.*, 2002a), lo que generaría unas concentraciones plasmáticas de progesterona insuficientes para ofrecer un medio ambiente uterino adecuado al momento de transferir el embrión, ello desencadenaría pérdidas embrionarias, ya que se ven afectados los mecanismos de establecimiento y mantenimiento de la gestación (Chagas *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2010).

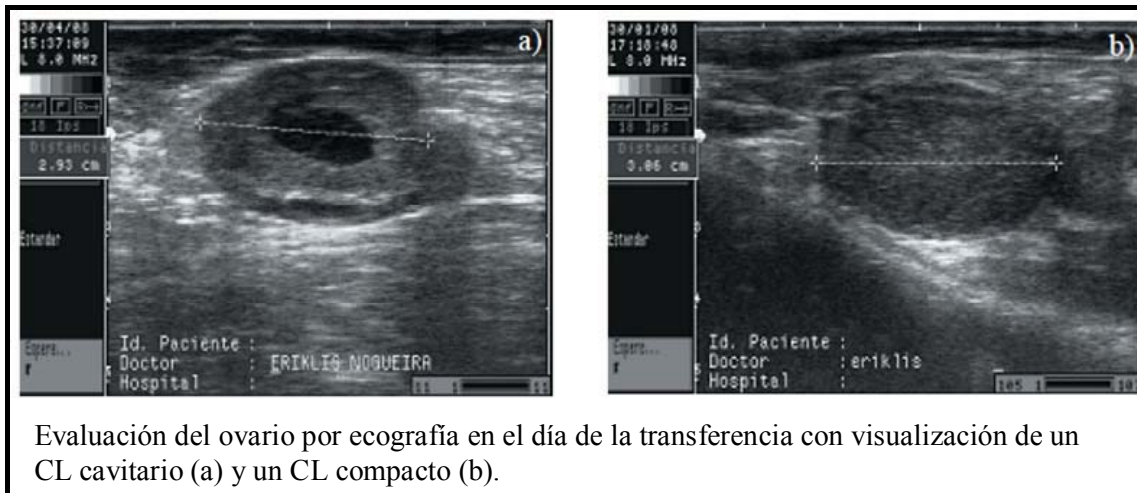
Al transferirse el embrión en las anteriores condiciones, va a retardarse el proceso de síntesis y secreción de la proteína trofoblástica bovina, desencadenando la activación de los mecanismos luteolíticos que abren campo a un nuevo ciclo estral (Rodina *et al.*, 2009).

El tamaño del folículo ovulatorio (diámetro folicular), el volumen del cuerpo Lúteo (VCL) y la secreción de progesterona, son para algunos autores consultados, factores relacionados con el establecimiento y mantenimiento de la gestación, lo que va a incidir directamente en la eficiencia o no del procedimiento de TE (Baruselli *et al.*, 2000a; Mann *et al.*, 2007), afectando el porcentaje de preñez (Bridges *et al.*, 2000; Spell *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2001; Lequarre *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2005). Por tanto, parece importante determinar en la hembra receptora el tamaño y la calidad de su cuerpo lúteo como herramienta que nos permita contar con información para decidir la aptitud de la receptora para recibir un embrión.

Tradicionalmente, se ha venido determinando la calidad del cuerpo lúteo de las receptoras en el momento de la transferencia, mediante exploración manual transrectal, de la receptora, siguiendo la clasificación propuesta por Nieman *et al.* (1985), que clasifica los CL en tres categorías:

- CL1: Excelente: cuerpo lúteo grande, bien definido y con corona.
- CL2: Regular: cuerpo lúteo pequeño, bien definido y sin corona.
- CL3: Malo: cuerpo lúteo pequeño, poco definido y sin corona.

Por otra parte, el uso de la ultrasonografía constituye una herramienta que ha facilitado el estudio de los fenómenos fisiológicos en la reproducción de una manera poco invasiva, en particular para la comprensión de la dinámica folicular y los cambios presentes en el ovario durante el ciclo de la hembra bovina (Adams *et al.*, 1992) y se ha demostrado que es importante determinar el tamaño de las estructuras ováricas antes de realizar la transferencia del embrión a la hembra receptora con la ayuda de técnicas ultrasonográficas (Vasconcelos *et al.*, 2001).



Evaluación del ovario por ecografía en el día de la transferencia con visualización de un CL cavitario (a) y un CL compacto (b).

Foto 25: Imagen ecográfica de dos CL de hembra bovina.

Vieira *et al.* (2014), encuentra correlación positiva entre tamaño del CL y porcentaje de preñez de las receptoras, aunque reconoce que podría llegar a existir una limitación en su estudio por el hecho de que la calidad del CL se evaluó mediante palpación transrectal, y afirma que aunque las elegidas para recibir un embrión deberían tener las mejores estructuras de CL, cabe esperar que la selección de las receptoras por métodos menos subjetivos como la ecografía, mejoraría la exactitud en la selección y potencialmente la fertilidad en los programas de TE.

También Baruselli *et al.* (2000b) en Brasil, en receptoras de embriones bovinos (*Bos indicus* x *Bos taurus*) determinó las siguientes porcentajes de preñez dependiendo de la calidad del CL: 58,4% (47/77) con CL1; 41,5% (17/41) con CL2, y 31,8% (7/22) con CL3, encontrando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) y Rodrigues (2003), en receptoras de embriones *Bos taurus* x *Bos indicus* tratadas con GnRH en el momento de la ovulación ($n=396$), obtuvo las siguientes tasas de preñez de acuerdo al tamaño del CL (palpación rectal): CL1, 50,6%; CL2, 47,2%; CL3, 31,4% encontrando igualmente diferencias significativas ($P < 0,05$).

Kastelic *et al.* (1990), estudia que el “área de tejido luteal” y la concentración de progesterona plasmática están relacionadas positivamente, por eso el autor comenta que la valoración por medio de ultrasonografía de los cuerpos lúteos se convierte en una alternativa viable para la determinación de las concentraciones de progesterona por la valoración de la función luteal en novillas raza Holstein.

Mann *et al.* (2007), señala que a partir del día 5 posovulación, se comprueba una fuerte relación positiva entre el “peso del cuerpo lúteo” y la concentración plasmática de progesterona, en un grupo de vacas Holstein a las que se les aplicó terapia hormonal para el control del ciclo estral, e igualmente Nogueira *et al.* (2012), encuentra una correlación positiva entre el diámetro del CL y la probabilidad de preñez (Figura 31).

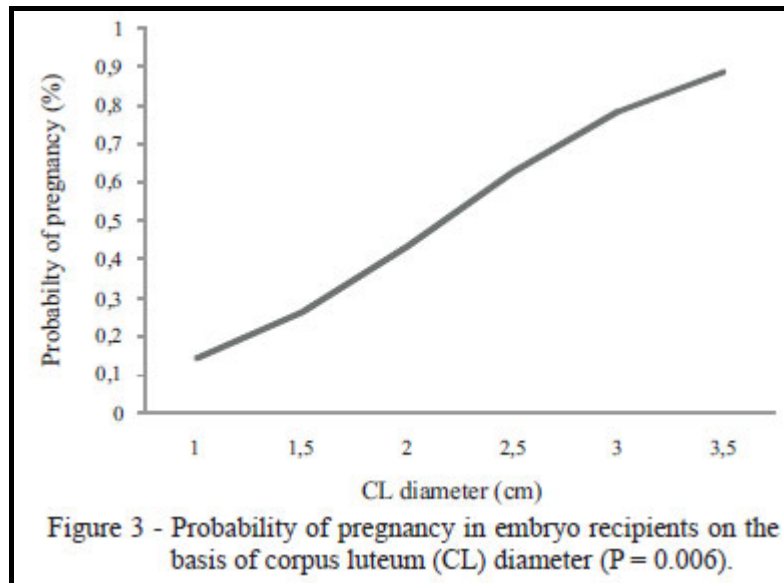


Figura 31: Probabilidad de preñez en receptoras de embriones basado en el diámetro del CL (Nogueira *et al.*, 2012).

Sartori *et al.* (2002a), evidenció también una relación positiva entre el volumen del cuerpo lúteo y los niveles sanguíneos de progesterona en novillas, vacas lactantes y vacas secas de la raza Holstein, lo cual fue analizado durante el día 7 posovulación. De la misma forma Spell *et al.* (2001), señala esta relación entre el VCL y las concentraciones de progesterona plasmática en hembras de aptitud cárnica, a las cuales se aplicó terapia hormonal para realizar la transferencia de embriones a tiempo fijo. De esta manera, los hallazgos señalados por los anteriores autores, permiten pensar que al presentarse un cuerpo lúteo desarrollado, se podría encontrar en sangre niveles de progesterona que favorezcan la preparación de un medio ambiente uterino adecuado para el desarrollo del embrión y las subsiguientes etapas de la implantación y mantenimiento de la gestación (Gonella *et al.*, 2010).

Cutini *et al.* (2000), mostraron la gran variabilidad que existe en los diferentes trabajos realizados por distintos autores, indicando que no se puede establecer una relación inequívoca y clara entre la calidad del CL y el porcentaje de preñez en bovino (Tabla 7)

Tabla 7: Efecto de la calidad del CL, estimada por tamaño y consistencia a la palpación, sobre el porcentaje de gestación de receptoras en TE (Cutini *et al.* 2000).

Autores	Calidad	Receptoras transferidas (n)	Receptoras Preñadas (n)	Receptoras preñadas (%)
Donaldson (1985)	Excelente	-	-	62,5
	Buena	-	-	59,2
	Regular	-	-	61,3
	Dudosa	-	-	47,7
Hasler y col. (1987)	1	1193	911	76,4
	2	348	251	72,1
	3	58	46	79,3
Liebrich. (1991)*	Muy buena	155	76	49,0
	Buena	78	40	51,3
	Regular y mala	98	51	52,0
Bó y col. (1999)**	1	107	55	51,4
	2	220	112	50,9
Lagomarsino (1999)***	1	378	183	48,4
	2	196	110	56,1



Por otra parte, debido a la importancia del cuerpo lúteo en la preñez, diferentes autores han buscado optimizar este factor, ya sea asegurando la formación del mismo, buscando un buen tamaño o estimulando la formación de varios cuerpos lúteos. En este sentido, Binelli *et al.* (2001), con el objeto de elevar la tasa de concepción, usó diferentes estrategias farmacológicas consistentes en el uso de hCG, GnRH o LH el día 7 después del estro, induciendo la formación de CL accesorios por luteinización de los folículos dominantes o ejerciendo un efecto luteotrópico adicional propio de la hCG, que estimula la producción de progesterona. En el estudio mencionado se obtuvieron los siguientes resultados en concentraciones de progesterona (ng/ml) el día 13: $(4,79 \pm 2,79)$ $(8,42 \pm 3,64)$ $(6,07 \pm 3,09)$ para GnRH, hCG y LH, respectivamente. Concluyeron que con el uso de estas hormonas, se eleva la cantidad de receptoras aptas para recibir un embrión en la evaluación posincronización, comparado con el grupo control, sin tratamiento.

De manera similar, otros autores han diseñado protocolos que buscan favorecer la formación de uno o más cuerpos lúteos, así, Nasser *et al.* (2004), compararon cuatro protocolos de sincronización en novillas receptoras F1 *Bos indicus* x *Bos taurus*. Un grupo fue tratado con eCG el día 5 u 8 del protocolo de sincronización con dispositivos intravaginales de liberación de progesterona (PRID[®]), paralelamente, se llevó a cabo un estudio en el que se determinaba el efecto de la administración de progesterona inyectable en el momento del implante con el dispositivo de progesterona. El estudio no mostró diferencias entre los tratamientos con y sin progesterona, mientras que el tratamiento con eCG incrementó estadísticamente la cantidad de cuerpos lúteos (1,32a eCG día 5, 1,03b eCG día 8, 1,37a eCG día 5+ P₄ y 1,22ab eCG día 8+ P₄) (valores con superíndices diferentes expresan diferencias significativas), mientras que para la tasa de preñez, no hubo diferencias significativas entre los grupos eCG día 5 (38/75, 50%), eCG día 8 (30/75, 40%), eCG día 5+ P₄ (33/76, 43%) y eCG día 8+ P₄ (31/75, 41%).

En otro estudio, Nogueira *et al.* (2004), señalan que un incremento en la concentración de progesterona, no mejora las tasas de preñez en programas de TE. En ese estudio se administró eCG a tres grupos (control sin eCG, 200 U.I., 400 UI y 600 UI), a pesar de que se aumentaron las concentraciones plasmáticas de progesterona (3,93 ng/ml, 4,24 ng/ml, 5,95 ng/ml y 7,81 ng/ml, respectivamente), no hubo cambios significativos en los porcentajes de gestación (41,9%; 50%; 25% y 20,9%), e incluso, se observó una tendencia a la disminución en las mismas.

Tampoco Barceló-Fimbres *et al.* (2009), encontraron diferencias en los porcentajes de gestación ($P > 0,10$) cuando se transfieren embriones producidos *in vitro* en receptoras que en el momento de la transferencia, tenían cuerpos lúteos sólidos ($n = 47$), frente a receptoras con cuerpos lúteos cavitarios observados por ultrasonografía ($n = 26$); obteniendo porcentajes de gestación del 34% y 46%, respectivamente.

Los anteriores hallazgos sugieren que el cuerpo lúteo con cavidad, podría tener la misma actividad de producción de progesterona sin afectar a los porcentajes de gestación, siempre que la pared contenga suficiente tejido luteal. En conclusión, el uso de estrategias para manipular la producción de progesterona, ya sea por aumento de tamaño, o por la formación de varios cuerpos lúteos, si bien no mejora de manera significativa los porcentajes de gestación, muestra una leve tendencia a aumentarlos. Es importante resaltar que estos tratamientos tienen un efecto beneficioso en cuanto a la



eficiencia de la sincronización, favoreciendo que un mayor porcentaje de receptoras, se encuentren aptas al momento de la transferencia.

II.8.7.- Aspectos relacionados con el sincronismo donante-receptora

El sincronismo que se establece entre la donante 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 donante y la receptora, se dice que existe asincronismo positivo, cuando la receptora se presenta en celo antes que la donante. Por el contrario, se considera un asincronismo negativo, cuando la receptora presenta celo después que la donante (Cutini *et al.*, 2000).

Se ha llegado a tolerar hasta un asincronismo de ± 48 h. (Lindner and Wright, 1983, Mapletoft *et al.*, 1988), y se ha observado que no se producen grandes diferencias de gestación con asincronismos de hasta ± 36 h.. No obstante, se considera que para la obtención de buenos resultados, no se debe superar las ± 24 h. de asincronismo (Callesen *et al.*, 1994; Mapletoft, 1989 y Palma, 2001).

Cuando la donante y las receptoras presentaron celo simultáneamente, se obtuvieron los porcentajes de gestación más elevadas en varios trabajos (Donaldson, 1985; Newcomb, 1979; Rowson *et al.*, 1972; Shea *et al.*, 1976 y Sreenan *et al.*, 1975), sin embargo, generalmente se considera que es más probable obtener mejores resultados transfiriendo a receptoras con asincronismo positivo (Breuel *et al.*, 1991; Coleman *et al.*, 1987; De Armas *et al.*, 1986; Hasler *et al.*, 1987; Kanawaga, 1993 y Wright, 1981). Si bien la causa es desconocida, es probable que los embriones de vacas superovuladas estén levemente más avanzados en el desarrollo que aquellos provenientes de un animal no superovulado, de allí que tengan mayor posibilidad de implantarse en una receptora con un ciclo estral más avanzado.

También Bó *et al.* (2004a), obtuvieron mayores porcentajes de gestación con receptoras que se encontraran en los días 7,5 y 7 ($P < 0,05$). Los días 8 y 6,5, tuvieron valores intermedios. Con respecto a una hipotética sincronía de donante-receptora, el porcentaje de gestación fue mayor en su estudio con una asincronía de ± 12 h (50,2%), respecto a asincronías de ± 24 h (39,7%) o de ± 36 h (27,0%). El mayor porcentaje de gestación lo obtuvieron cuando la receptora estuvo en celo 12h antes que la donante (día 7,5; 54,4%).

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



II.9- Factores que afectan a la eficiencia del trasplante de embriones, relacionados con el embrión

A partir del desarrollo de la técnica de transferencia se observó que tanto la calidad de los embriones como el estadio de desarrollo, podían afectar el resultado de la aplicación de la misma (Cutini *et al.*, 2000).

II.9.1.- Calidad del embrión

Existen diferentes trabajos que indican que embriones Grado 1, tienen más altas probabilidades de alcanzar la preñez que aquellos clasificados como de Grado 2, tanto en transferencias en fresco, (Tabla 8), como congelados (Tabla 9). 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 gestación, mientras que embriones de buena calidad y transferidos con algún tipo de defecto, resultan en gestaciones y nacimientos normales (Cutini *et al.*, 2000).

Tabla 8: Efecto de la calidad de embriones producidos *in vivo* y trasferidos en fresco sobre el porcentaje de preñez (Cutini *et al.* 2000).

Autores	Calidad Embrionaria	Embriones Transferidos	Receptoras Preñadas	
			Nº	%
Wright(1981)	Buena	1748	1122	64,2 ^a
	Regular	438	198	45,2 ^b
	Pobre	100	33	33,0 ^c
Hasler et al.(1987)	Buena	5521	4037	73,1 ^a
	Regular	304	181	59,5 ^b
	Pobre	76	31	40,8 ^c

Valores con superíndices diferentes dentro de cada autor difieren: P<0,05

Tabla 9: Efecto de la calidad de embriones producidos *in vivo* previo a la congelación sobre el porcentaje de gestación (Cutini *et al.*, 2000).

Autores	Calidad Embrionaria pre-congelación	Embriones Transferidos	Receptoras Preñadas	
			Nº	%
Leibo(1986)	Excelente	173	84	48,6 ^a
	Buena	220	98	44,6 ^a
	Regular	83	20	24,1 ^b
Arreseigor et al.(1998)	Excelente	233	133	57,1 ^a
	Buena	276	146	52,9 ^a
	Regular	276	86	31,2 ^b
Munar et al.(1998)	Excelente	1633	996	60,9 ^a
	Buena	565	301	53,3 ^b
	Regular	123	49	39,8 ^c

Valores con superíndices diferentes dentro de cada autor difieren: P<0,05



En los trabajos publicados, se registran mayores porcentajes de preñez con embriones con grados 1 y 2, en comparación con aquellos embriones considerados como de grado 3.

Según Mollo *et al.* (2007), en su trabajo en donde analizaron diferentes variables para determinar cuáles eran las que afectaban significativamente al resultado de preñez, observaron que la calidad era una de esas variables, ya que el resultado para los embriones de grado 1, fue de 54,5%, mientras que el porcentaje para aquellos embriones de grado 3 fue de 31,9% ($P < 0,0001$).

En otro estudio realizado por Ake *et al.* (1994), solamente observaron diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre embriones de calidad excelente y mala (63,4% vs. 22,2%) ($P < 0,05$).

La variación que existe en los diferentes trabajos publicados puede deberse en parte, a que la evaluación que se realiza sobre los embriones es subjetiva y en muchas ocasiones cuesta definir de qué calidad son éstos. De hecho, el manual de la Sociedad Internacional de Embriones dice textualmente que: "...*Se debe reconocer que la evaluación visual de embriones es una evaluación subjetiva de un sistema biológico y no es una ciencia exacta...*".

Por otra parte, la incapacidad de lograr la gestación por parte de algunos embriones clasificados como de buena calidad puede ser explicado en parte por el estudio realizado por Aguilar and Gallina (2002), en el cual encontraron que el 30% de los embriones clasificados como de buena calidad, al ser evaluados por microscopía de luz y electrónica, presentaron características de embriones en estado de degeneración. De esta forma demostraron que hoy en día, la clasificación es muy subjetiva y se realiza por microscopía estereoscópica, por lo que tiene sus errores, lo que hace que embriones que en realidad son de mala calidad, sean transferidos o más grave aún, congelados, disminuyendo la posibilidad de una gestación. En cualquier caso, se debe tener en cuenta que la técnica TE es multifactorial y contemplar una sola variable por separado, tampoco nos brinda mucha información.

II.9.2.- Estado de desarrollo del embrión

Se ha conocido por mucho tiempo que la calidad y el desarrollo del embrión ejercen una marcada influencia sobre los resultados de la TE. Curiosamente, se ha comprobado que en la producción de embriones *in vitro* se observa un desarrollo ligeramente más rápido que el de TE convencional; prueba de esto es que embriones FIV de día 7, son principalmente blastocistos expandidos, mientras que *in vivo* este mismo día, se encuentran mayormente blastocistos tempranos (Chesne *et al.*, 1987; Callesen *et al.*, 1996).

Cuando se analizaron los resultados obtenidos según el estadio de desarrollo, se observó que hay variedad de resultados citados en la bibliografía, obsérvese los resultados obtenidos de gestación según el estado de desarrollo del embrión por Ake *et al.* (1994); Peres *et al.* (2006) y Bó *et al.* (2006), que aparecen en (Tabla 10); así, en algunos casos, blastocistos tempranos y blastocistos, resultaron con mayores porcentajes de preñez que mórulas, blastocistos expandidos y blastocistos protruidos (Hasler *et al.*, 1987).



Otros autores, obtuvieron mejores resultados con blastocistos que con mórulas; 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 hallado efecto del estadio de desarrollo (Cutini *et al.*, 2000).

Según Cutini *et al.* (2000), los porcentajes de preñez para embriones frescos producidos *in vivo* y transferidos en estadio de mórula han sido muy variados, oscilando entre 48 y 70%. Cuando los que se transfirieron fueron blastocistos, los porcentajes de de gestación fueron del 65%-70%.

Tabla 10: Porcentajes de preñez obtenidos según estado de desarrollo de embriones bovinos de acuerdo con distintos autores consultados. Valores con superíndices diferentes dentro de cada autor difieren en $P < 0,05$.

Autores	Estado embrionario	Embriones transferidos	% de gestación
Ake <i>et al.</i> (1995)	Mórula	13	38,4% ^a
	Blastocisto	75	53,3% ^a
Peres <i>et al.</i> (2006)	Mórula	405	53,8%
	Blastocisto temprano	446	59,4%
	Blastocisto	291	51,8%
	Blastocisto expandido	18	33,3%
Bó <i>et al.</i> (2006)	Mórula	488	50,2% ^b
	Blastocisto temprano	151	49,7% ^b
	Blastocisto	171	37,4% ^c
	Blastocisto expandido	50	34,0% ^c

En relación al estado de desarrollo del embrión, Looney *et al.* (2006), encontraron que la transferencia de una mórula temprana, presenta menores tasas de preñez que cuando se transfieren embriones en estadio más avanzado.

En cambio, Hasler (2001), presenta porcentajes de gestación estadísticamente significativos ($P < 0,05$), para embriones de calidad 1 (73,2%), calidad 2 (68,3%) y calidad 3 (56,3%), pero no encuentra diferencias entre diversos estadios de desarrollo. Esto puede ser explicado debido a que al transferir un embrión cuyo desarrollo haya sido más rápido, podría expresar más rápidamente, los factores de reconocimiento de gestación, comparado con un contemporáneo de menor desarrollo. Esta explicación podemos encontrarla en los resultados del trabajo de Block and Hansen (2007), quienes encuentran diferencias significativas en secreción de IFN- τ en embriones de diferente tamaño, hallando una correlación positiva entre el tamaño del embrión y la producción de IFN- τ ($P < 0,001$).

Si bien existe una clara tendencia a que los porcentajes de gestación en embriones de calidad excelente y en embriones de mayor desarrollo, es mejor, en la aplicación comercial de la técnica, no siempre es recomendable transferir solo embriones de calificación excelente o solo embriones de desarrollo avanzado. En el resultado final de la aplicación del TE, hay que buscar un equilibrio entre la cantidad total de receptoras



gestantes y los porcentajes de gestación; para el ganadero, es mejor mayor cantidad de gestaciones, sacrificando un poco los porcentajes, que unos buenos porcentajes de gestación, con pocas receptoras gestantes.

II.9.3.- Edad del embrión

Muchos de los datos publicados sobre el efecto de la edad embrionaria y/o del estadio de 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 sincronismo 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 no encontraron diferencias en los porcentajes de preñez después de la transferencia de embriones de 6 a 8 días (Newcomb and Rowson, 1975; Newcomb and Rowson, 1980; Shea, 1981; Wright, 1981).

Por otro lado, la transferencia de embriones de 9 días o más, prácticamente no se realiza, pues es dificultoso encontrar los embriones en el medio de lavado después de que los mismos han perdido la zona pelúcida. No obstante, cuando se realizaron transferencias con dichos embriones, los resultados fueron contradictorios y mientras algunos autores no hallaron disminución en los porcentajes de preñez (Newcomb and Rowson, 1980; Shea, 1981), otros observaron menores valores que cuando utilizaron aquellos de días 6-8 (Hasler *et al.*, 1987).

Los resultados de gestación después 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 (78% vs. 68%, respectivamente) (Agca *et al.*, 1998).

Por su parte, Hasler *et al.* (1995), habían comunicado resultados de gestación 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. Por su parte 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.

II.9.4.- Crioconservación

Independientemente del método de criopreservación utilizado, la selección de embriones para ser criopreservados es siempre un factor importante que influye en el éxito del procedimiento de la TE.

El estado de desarrollo embrionario puede ser un factor que afectan a la eficacia de la crioconservación. Embriones en fase inicial (mórula pre-compactación) generalmente, sobreviven peor al ciclo de congelación-descongelación. Normalmente, los estados de desarrollo del embrión bovino más habituales (recuperados 7 días después del estro), van desde la mórula compactada al blastocisto y son los más utilizados para la



transferencia de embriones bovinos no quirúrgica, sobreviviendo a la criopreservación con un alto grado de éxito (Bondioli, 2015).

El grado de "calidad" del embrión es un factor que varía considerablemente y tiene también una gran influencia en la eficiencia de la criopreservación. Las características morfológicas de los embriones bovinos que son la base de la clasificación, fueron descritos por Linder and Wright en el año 1983; Estos criterios para la clasificación de embriones, así como los criterios para la clasificación de la etapa embrionaria, se han descrito en el Manual de la IETS de Transferencia Embrionaria (2010), siendo ampliamente aceptado como un estándar para los procedimientos empleados para la transferencia de embriones en todo el mundo.

Es importante tener en cuenta que muchas de las diferencias en las características morfológicas que constituyen los criterios de clasificación de embriones se amplifican por el proceso de congelación y descongelación. Muchas de estas diferencias por las que se asignan los grados de menor calidad a los embriones, son un reflejo directo o indirecto del estado de agregación de las células del embrión, las diferencias de tamaño y la presencia de células separadas del embrión en el espacio perivitelino. Del ciclo de congelación-descongelación sólo cabe esperar que reduzca el número de células viables, por lo tanto, es una práctica común limitar la aplicación de la crioconservación a embriones con grados de mejor calidad (grados 1 o 2).

Bondioli (2015), afirma que aunque la etapa de desarrollo es un factor importante en la criopreservación de embriones para algunas especies (humanos, cerdos y caballos, por ejemplo), no lo es para la crioconservación de embriones bovinos, ya que en esta especie, no se observan diferencias en la capacidad de sobrevivir a la criopreservación basado en la fase embrionaria (Looney *et al.*, 1989). Existe una posible excepción a esto para los blastocistos eclosionados, que se ha comprobado que no sobreviven bien a la criopreservación. Blastocistos eclosionados normalmente no se recuperaron en el día 7 en el bovino, pero se encuentran a veces, cuando la colección se retrasa hasta el día 8.

Bó *et al.* (2012a), sobre 1.333 embriones congelados en ETG y TD a receptoras *Bos indicus x Bos taurus*, en la misma granja, obtiene diferencias significativas ($P < 0,05$) en los porcentajes de gestación entre mórulas compactadas, jóvenes blastocistos y blastocistos (55,4%, 59,4%, 52%, respectivamente), frente a los blastocistos expandidos, con un 39,7%.

En cuanto a embriones frescos frente a congelados, Hasler (2001), en una recopilación de datos de diferentes equipos y periodos, encuentra diferencias significativas entre embriones transferidos en FRE (70,5%) y congelados-descongelados en GLI (60,9%) ($P < 0,001$).

A su vez, la calidad embrionaria poscongelación también afecta los porcentajes de preñez, con valores que oscilan entre el 30% al 68% para embriones de calidad regular y excelente respectivamente (Munar and Hasler, 1989).

El método de crioconservación utilizado debe tenerse en cuenta. Cuando los embriones son congelados convencionalmente, las tasas de preñez oscilan entre 50% al 60% resultando levemente inferiores a las obtenidas con embriones frescos (Beal *et al.*, 1998; Cabodevilla, 1997; Cutini *et al.*, 1999; Dochi *et al.*, 1998; Hill, 1996; Munar *et al.*, 1989; Munar *et al.*, 1998; Nibart and Humblot, 1997; Pettit, 1985).



Ponsart *et al.*, (2000), en una revisión de datos de 2.134 transferencias entre 1996 y 1998, obtiene diferencias significativas entre embriones congelados-descongelados en ETG y GLI, (55,4% vs. 47,2%, respectivamente) ($P < 0,03$).

En cambio, cuando se utiliza la vitrificación como método de conservación, los porcentajes de gestación pueden ser muy dispares, desde 0% al 60% (Agca *et al.*, 1994; De Leeuw *et al.*, 1992; Rall, 1992; Tachikawa *et al.*, 1993; Van Wagendonk *et al.*, 1994).

Por último, señalar que el efecto de la criopreservación de los embriones, sobre los resultados de gestación, es muy variado y ello se debe a que se producen interacciones con otros factores tales como la edad embrionaria, la calidad embrionaria, el estado de desarrollo y el método de producción, *in vivo* o *in vitro*.

II.10.- Factores que afectan a la eficiencia del trasplante de embriones relacionados con la aplicación de la técnica

El equipo técnico encargado de realizar los diferentes procedimientos durante las diferentes etapas de la técnica de TE, también interviene directamente en la obtención de buenos resultados tras la aplicación de esta biotecnología, por esto es de gran importancia que esté compuesto por un personal cualificado y con experiencia.

Los factores más importantes relacionados con la transferencia propiamente dicha que pueden influir en el resultado del programa son los mecanismos para colectar embriones, la clasificación y manipulación de embriones, la ubicación del embrión en el útero, la experiencia del operador, la protección del instrumental de transferencia y la utilización de sedantes, relajantes uterinos y/o anestesia epidural.

II.10.1.- Mecanismos para colectar embriones

Los embriones bovinos, destinados a un programa de TE pueden ser obtenidos del útero por medios no quirúrgicos. Su recolección y transferencia con éxito dependen entre otros factores de que la técnica de obtención no ponga en peligro la integridad del tracto genital, a fin de poder repetirla tantas veces como sea deseable y conveniente (Palma, 2001).

La primera técnica usada para la recolección de embriones bovinos fue quirúrgica, el porcentaje de embriones y ovocitos obtenidos con este método varió entre el 50% y 70% (en función del número de cuerpos lúteos presentes), lo que resulta aceptable, encontrándose incluso porcentajes de gestación ligeramente más altos que con la técnica no quirúrgica (Mapletoft, 1980), sin embargo, se ha comprobado que la manipulación quirúrgica del útero y de los ovarios conduce a lesiones que provocan formación de fibrina y adherencias, lo que constituye una seria limitación al uso repetido de este procedimiento e impidió su difusión en la práctica durante años.

Las primeras experiencias con la recolección no quirúrgica de embriones se remontan a la década de los cuarenta (Rowson and Dowling, 1949), donde se obtuvieron resultados satisfactorios y repetibles (Seidel *et al.*, 1977).



La posibilidad de colocar en la especie bovina la sonda a través de la cervix, abrió nuevas posibilidades a la recolección de embriones, simplificando el procedimiento y disminuyendo el trauma uterino (Palma, 2001).

La obtención de los embriones debe ser realizada por un profesional con experiencia en este tipo de actividades, ya que se realiza una gran manipulación del útero y cualquier imprecisión en el manejo de este órgano, causaría disminuciones en la obtención de buenos resultados debido a la liberación de prostaglandinas a nivel uterino (Bó *et al.*, 2003a).

II.10.2.- Clasificación y manipulación de embriones

Después de la obtención de los embriones, debe hacerse una muy buena clasificación de éstos, descartando estructuras que demuestren degeneración y que no coincidan con la edad, porque esto indicaría que en algún momento del ciclo, detuvieron el desarrollo (Bó, 2003).

La evaluación visual de los embriones no es una ciencia exacta, sino es una técnica subjetiva utilizada para evaluar un sistema biológico en desarrollo (Görlach, 1999). En ese sentido, para obtener los mejores resultados, es importante tener en cuenta el sistema de clasificación según la IETS, basado en códigos numéricos, para el estado de desarrollo y la calidad del embrión (Figura 15) (Fotos 8 a 13).

Los estados de desarrollo se clasifican en: “1” (no fecundado); “2” (de dos a dieciséis células); “3” (mórula temprana); “4” (mórula); “5” (blastocisto temprano); “6” (blastocisto); “7” (blastocisto expandido); “8” (blastocisto eclosionado) y “9” (blastocisto eclosionado expandido).

Por calidad, los embriones se clasifican en: “1” (excelente o bueno); “2” (regular); “3” (malo); “4” (muerto/degenerado) (Stringfellow, 2010).

El Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones cita textualmente que: *“Hay que reconocer que la evaluación visual de embriones es una evaluación subjetiva de un sistema biológico, no es una ciencia exacta. Además, hay otros factores tales como las condiciones ambientales, de calidad y la capacidad de destinatario técnico que desempeñan papeles importantes en la obtención de embarazos de embriones transferidos. También se reconoce que muchos sistemas diferentes se utilizan para la clasificación de los embriones y que algunos son más sofisticados que son otros. Los criterios para la asignación de un “ código de calidad ” en los formularios estandarizados se simplificaron a ser “ fáciles de usar”. En general, a menos que se especifique lo contrario, sólo el Código 1 embriones deben ser utilizados en comercio internacional”*.

Después de ser clasificados los embriones, pueden ser empajuelados y ser congelados, o también, pueden ser empajuelados en un medio nutritivo para ser transferidos en fresco a una hembra receptora previamente seleccionada y sincronizada, la cual debe encontrarse en el día siete postcelo para que coincida con la edad del embrión que va a recibir en su útero (Görlach, 1999).



Tanto la clasificación, como la manipulación de embriones son procedimientos que requieren de una gran experiencia y entrenamiento para poderlos llevar a cabo con la máxima eficacia, y que sin duda influyen en el resultado final de la técnica del TE.

II.10.3.- Ubicación del embrión en el útero y experiencia del operador

Trabajos llevados a cabo hace tiempo han demostrado que el embrión debe ser transferido al cuerno uterino ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo (Newcomb and Rowson, 1976; Newcomb *et al.*, 1978; Sreenan, 1976; Tervit, *et al.*, 1977). Teniendo en cuenta que la migración transuterina rara vez ocurre en bovinos (Tervit, *et al.*, 1977), Kanawaga (1993), afirmó, que dicha ubicación va a favorecer el reconocimiento maternal de la gestación.

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 pero Rowe *et al.* (1980), no encontraron diferencias en el porcentaje de gestación entre los tercios anterior y medio, mientras que Callesen *et al.* (1994), en un estudio que involucró a más de 2.000 transferencias, observaron mejores resultados transfiriendo en el tercio anterior, con respecto al medio y especialmente al posterior.

En este sentido, Sreenan and 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, lo que se corrobora en su trabajo. Rowe *et al.* (1980), demostraron que el tiempo que transcurre entre atravesar el cérvix y colocar el embrión en el cuerno uterino, se correlaciona negativamente con el porcentaje de gestación.

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 se atraviesa el cérvix sin dificultad, los porcentajes de preñez son mayores (Boland *et al.*, 1976; Bowen *et al.*, 1978).

En este sentido, Hasler (2001), así como Ponsart *et al.* (2000), observan diferencias significativas entre los técnicos que realizan las transferencias ($P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente).

Del mismo modo, operadores con experiencia pueden lograr buenos porcentajes de preñez (50%), aún cuando deban transferir los embriones a receptoras que presentan un cuello uterino tortuoso, difícil de pasar para alcanzar el cuerno uterino (Wright, 1985), por otra parte, este mismo autor, comparó los porcentajes de preñez de transferencias efectuadas en el cuerno derecho, con las que se llevaban a cabo en el cuerno izquierdo, no encontrando diferencias significativas.

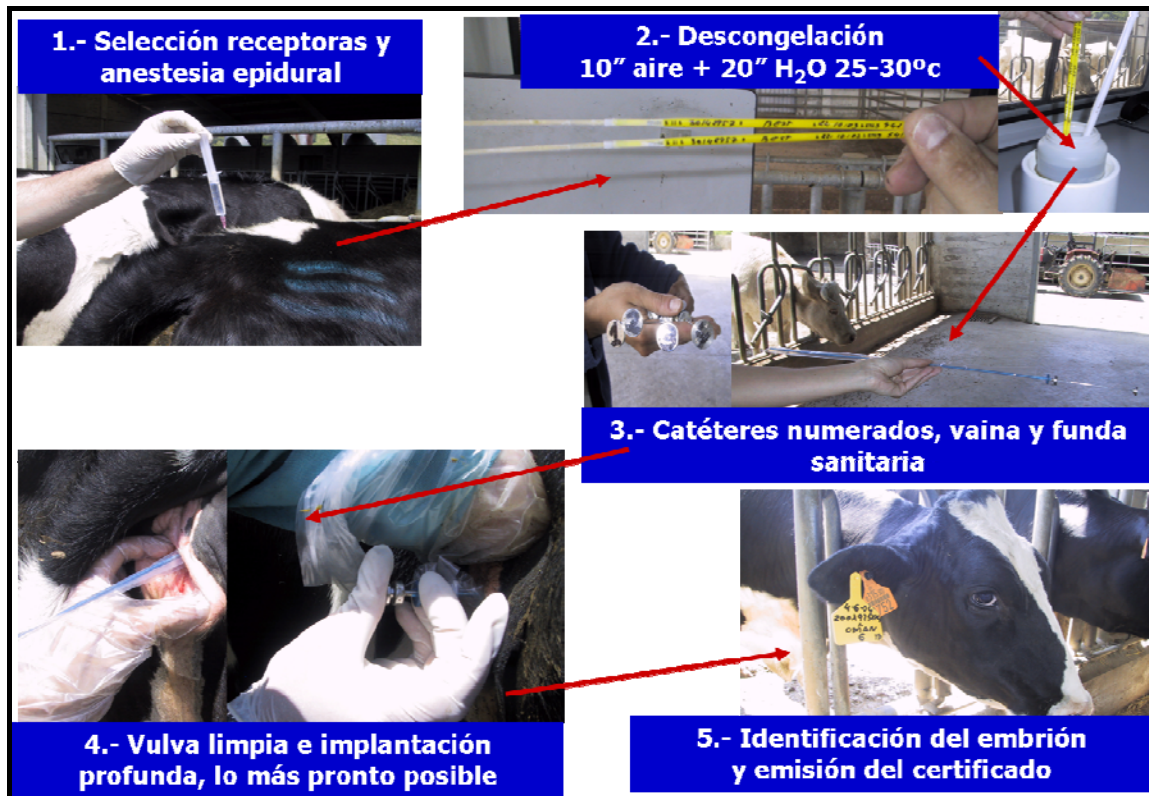


Foto 26: Secuencia del proceso de descongelación y TD de embriones.

Munar *et al.* (1989), aportaron que el grado de dificultad al atravesar el cérvix con el instrumental y la dificultad para depositar el embrión en el sitio deseado del útero, afectaban significativamente la tasa de abortos.

Schrick *et al.* (2003), presentó datos que indican un significativo descenso en el porcentaje de gestación cuando la dificultad de la transferencia se incrementa, en este mismo sentido Bó *et al.* (2004a), afirmaba que la calificación de la transferencia por los operarios mostró que cuando se calificaba de buena o regular, se obtuvieron un mayor porcentaje de preñez estadísticamente significativo ($P < 0,05$), con respecto a cuando la transferencia se había calificado como mala; algunos autores especulan con la posibilidad de que una transferencia dificultosa, con excesiva manipulación del tracto reproductivo, puede provocar la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el útero, llevando a peores porcentajes de gestación.

Otra causa de liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante la transferencia del embrión, es la posible irritación que puede provocar el catéter al atravesar el cérvix de camino al útero, con la subsiguiente inflamación y descenso en el porcentaje de gestación resultante (Odensvik *et al.*, 1993).

Por último, en el trabajo realizado por Bó *et al.* (2004a), también se evidencian diferencias significativas ($P < 0,05$), en los resultados del porcentaje de gestación obtenidos al ser realizado el TE por cuatro operarios diferentes, de esta manera, demuestran que la aplicación de la técnica, afecta directamente a la eficiencia de un programa de TE.

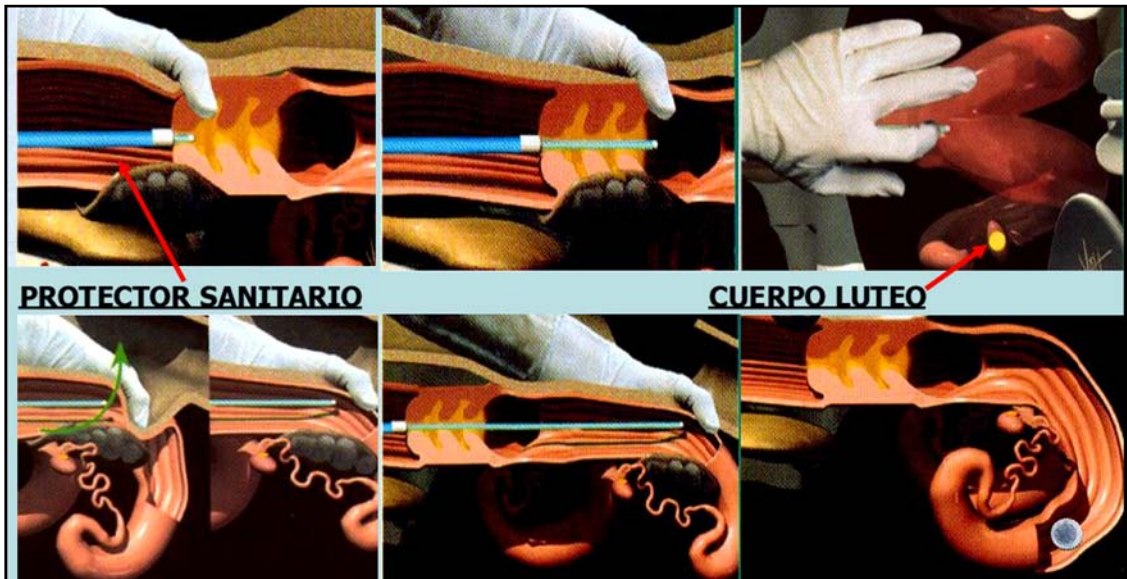


Figura 32: Maniobras a realizar para alcanzar el cuerno uterino y depositar el embrión en la hembra receptora. Técnica no quirúrgica. (Adaptada de Select Sires)

II.10.4.- Protección del instrumental de transferencia

Cuando se pasa el catéter de la implantación a través del cérvix, parte de la contaminación microbiana de la vulva y la vagina, pueden ser arrastrados y alcanzar el útero de la receptora con el consiguiente efecto negativo sobre la tasa de preñez, y más, si tenemos en cuenta que la transferencia del embrión se efectúa cuando la receptora se encuentra en fase luteal y su útero es si cabe, más susceptible a las infecciones.

Takahashi *et al.* (1982), citado por Kanagawa (1993), observaron que la protección del instrumental de transferencia con una vaina estéril durante su pasaje por la vagina y cérvix, incrementa de manera significativa el porcentaje de gestación. Sin embargo, Mapletoft *et al.* (1986), no corroboraron tales diferencias (Tabla 11).

Tabla 11: Porcentajes de preñez obtenidos con la protección o no del instrumental de transferencia con una vaina descartable estéril.

Autor	Modalidad	Receptoras transferidas	Gestaciones	
			Nº	%
Kanagawa, H. (1993)	Con vaina protectora	22	18	63,6a
	Sin vaina protectora	24	8	33,3b
Mapletoft <i>et al.</i> (1986)	Con vaina protectora	116	62	53,4a
	Sin vaina protectora	140	79	56,4a

a, b, difieren significativamente $P < 0,05$.

Nishigai (2003), también advierte en su estudio de la necesidad de impedir la posible contaminación del útero en la maniobra de implantación, sin embargo, sustituye el uso de la camisa sanitaria o vaina estéril por el espéculo vaginal, obteniendo igualmente buenos porcentajes de preñez y mostrando la utilidad del mismo como alternativa para conseguir la protección del instrumental en la transferencia no quirúrgica del embrión.



II.10.5.- Utilización de sedantes, anestesia epidural y/o relajantes uterinos

La utilización de sedantes, anestesia epidural y/o relajantes uterinos en el momento de la transferencia parece tener sentido, ya que disminuye la posibilidad de daño en el endometrio en la maniobra de implantación que pueden ocurrir en caso de que la hembra esté intranquila o nerviosa.

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, fueron probados por Almeida (1989); Mapletoft *et al.* (1986) y Wenkoff (1986), administrando clorhidrato de clembuterol 15-180 minutos antes de la transferencia, no encontrando mejoras en el porcentaje de preñez.

Nishigai (2003), a pesar de señalar en su estudio que el uso de xylacina puede tener un efecto uterotónico, encuentra mejores porcentajes de gestación en novillas receptoras de embriones cuando se usaba xylazina en la anestesia epidural aplicada en el momento de la transferencia, ya que según afirma, facilita la implantación y previene el posible daño uterino.

II.11.- Alternativas utilizadas con el fin de incrementar los porcentajes de gestación en la Transferencia de Embriones

Se ha podido comprobar que de un 25% a un 40% de las pérdidas embrionarias que ocurren en hembras receptoras de embriones, han tenido lugar en los primeros días de gestación (Santos *et al.*, 2004) y se observa un retorno a celo a los 20 a 22 días, lo que nos lleva a pensar, que la muerte embrionaria se ha producido entre los días 7 y 17 de gestación, entre el trasplante embrionario y el momento del RMG (Binelli *et al.*, 2001). Por tanto, tal como afirman Santos *et al.* (2001), podemos considerar que en el establecimiento de la preñez se presenta un “periodo crítico” muy concreto entre los días 15 a 17 de gestación y es precisamente en este periodo de adhesión del embrión al endometrio, donde se necesita de un perfecto sincronismo entre el embrión trasplantado y su receptora.

Thatcher *et al.* (2001a), sostiene que la hembra debe ajustar su estado fisiológico al hecho de estar o no gestante y si lo está, debe generarse un bloqueo efectivo antiluteolítico que a su vez va a depender de la habilidad del embrión en enviar señales para que el endometrio uterino responda a ese bloqueo en la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Estas señales, deben ser emitidas en el momento y en la concentración precisa, de tal manera que se garantice el mantenimiento de la estructura y funcionalidad del CL, que genere una continua producción de P_4 para el mantenimiento del ambiente embriotrófico que apoye el normal desarrollo del embrión (Binelli *et al.*, 2001; Mann and Lamming, 2001).

Hay que decir, tal como comprueba Binelli *et al.* (2001), que la comunicación entre el embrión y el útero, no siempre tiene éxito, lo que desencadena grandes pérdidas



embrionarias, es por este motivo por el que se han propuesto numerosas estrategias para intentar mejorar la fertilidad, sin embargo los porcentajes de gestación en la transferencia de embriones, no parece que hayan conseguido mejorar en el transcurso de los años y salvo excepciones, siguen manteniéndose entre el 50% y el 60%. (Fuentes and Liébana, 2012)

Las estrategias para mejorar la fertilidad, se pueden resumir en dos, aumentar los niveles de progesterona en sangre mediante diversos procedimientos y actuar en el período crítico del RMG, disminuyendo la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por parte del endometrio.

II.11.1.- Aumentar los niveles de P_4 en sangre

El establecimiento de la gestación se produce como resultado de la interacción entre un embrión competente y un ambiente uterino receptivo. La progesterona aquí juega un papel importante en los procesos reproductivos relacionados con el establecimiento y mantenimiento de la gestación a través de su acción sobre el endometrio uterino (Lonergan and Evans, 2015).

La P_4 es la precursora de los diferentes componentes que conforman este ambiente, cualquier variación en la concentración de P_4 es determinante en la modulación de la expresión y secreción de factores de crecimiento, citoquinas y proteínas, que condicionan el medio uterino para los procesos de receptividad endometrial y de viabilidad embrionaria (Mann *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2009; Beltman *et al.*, 2009).

De acuerdo con este planteamiento, parece lógico pensar que facilitar fuentes directas o indirectas de P_4 a hembras durante los primeros días de gestación, podría disminuir el porcentaje de pérdidas embrionarias, pues mejora el ambiente uterino en donde el embrión tendrá un desarrollo adecuado con mejor síntesis y secreción de $\text{IFN-}\tau$, ya que esta secreción está influenciada por el estado de desarrollo embrionario.

Lonergan and Evans (2015), afirman que se pueden tomar varios enfoques para aumentar las concentraciones periféricas de P_4 :

- 1.- Aumentando la función endogénica del CL existente, como las estrategias que promueven el crecimiento del folículo dominante antes de la ovulación, dando como resultado un CL más grande, o los tratamientos luteotróficos que estimulan el desarrollo del CL.
- 2.- Inducir la ovulación de un folículo dominante y la formación de un CL accesorio con la administración de hCG o GnRH en el día 5 al 7 del ciclo.
- 3.- Suplementar con progesterona directamente (por ejemplo, mediante la inserción de dispositivos intravaginales de P_4).

Por otro lado, Fuentes and Liébana (2012), señalan que se han venido intentado diversos tratamientos hormonales en hembras receptoras de embriones que llevarían a aumentar los niveles de progesterona en sangre y mayores porcentajes de gestación como son:



1. Aplicación de 500 U.I. de eCG en los protocolos de sincronización con progestágenos, en el momento de la aplicación de la prostaglandina o en el momento de la retirada del progestágeno, para favorecer el crecimiento del folículo dominante antes de la ovulación y obtener un CL grande.
2. Aplicación de 1.500 a 3.000 U.I. de hCG o 100 µg de GnRH el día de la transferencia, con el objetivo de inducir un cuerpo lúteo accesorio (Binelli *et al.*, 2001) (Santos *et al.*, 2001).
3. Inserción de un dispositivo de P₄ en el momento de la transferencia, y mantenerlo durante 10-12 días (Fuentes, 2000).
4. Utilización de protocolos de sincronización con dispositivos de progesterona durante 12 días, con el objetivo de inducir un folículo dominante grande que nos produzca un cuerpo lúteo de mayor tamaño y que pueda producir más progesterona.
5. Realizar protocolos de sincronización de receptoras induciendo una superovulación moderada con eCG, con el objetivo de tener más CL y consecuentemente más P₄ (Fuentes and de la Fuente, 1997; Fuentes and de la Fuente, 2000).

La administración de P₄ exógena mediante dispositivos vaginales entre el día 3 y 7 del ciclo, aumenta significativamente la concentración de P₄ en suero (P<0,05), a partir del día 3,5 en adelante, no aumenta el tamaño del embrión entre los días 5 y 7, pero si se asocia con un incremento del tamaño del embrión en el día 13 (P=0,034) y en el día 16 (P=0,012), período crítico para el RMG (Carter *et al.*, 2008). Sin embargo, debemos señalar que la bibliografía consultada muestra a menudo resultados inconclusos e incluso, contradictorios (Lonergan and Evans, 2015), así, mientras en varios estudios consultados, el aumento de concentraciones plasmáticas de P₄ durante el diestro, se relaciona positivamente con la capacidad del embrión en secretar IFN- τ , provocando así aumento en los porcentajes de gestación (Thatcher *et al.*, 2001b; Mann *et al.*, 2006), en otros, no se han observado esta relación y efecto. En este mismo sentido, la relación entre el porcentaje de gestación y la concentración plasmática de P₄ de acuerdo al tamaño del CL en receptoras de embriones bovinos, ha sido objeto de controversia en varios estudios realizados. Mientras algunos investigadores han verificado la correlación positiva entre estas variables, encontrando que a mayor área del CL, mayor es la concentración plasmática de P₄ y consecuentemente, mayor es el porcentaje de gestación (Kastelic *et al.*, 1990; Vasconcelos *et al.*, 2001; Bó *et al.*, 2002; Thatcher *et al.*, 2001b; Mantovani *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2007) y que con estos resultados, se podría evidenciar que los incrementos en la concentración de P₄ durante el "periodo crítico" estimula la secreción de los agentes antiluteolíticos con lo cual se hace eficiente el RMG (Vasconcelos *et al.*, 2001), sin embargo, contrariamente, otros autores como Spell *et al.* (2001), no han encontrado correlación entre las variables tamaño del CL, concentración de P₄ plasmática y porcentaje de gestación en hembras receptoras con embrión transferido. Lo que viene a demostrar, que a pesar de los efectos positivos de la administración de P₄ exógena mediante dispositivos intravaginales, sobre el desarrollo del embrión en las primeras fases (Carter *et al.*, 2008, Clemente *et al.*, 2009), no parece que ello se relacione con mayores porcentajes de gestación. Beltman *et al.* (2009), obtienen mayores concentraciones de P₄ periférica pero no mayor supervivencia



embrionaria y algunos autores incluso sugieren que la P₄ exógena, puede tener efectos adversos sobre el CL (O'Hara *et al.*, 2012).

Tampoco Purcell *et al.* (2005), obtienen diferencias significativas entre el grupo control y el que recibió un CIDR[®] durante 13 días y que se colocó el día de la transferencia, en vacas y novillas de carne y Marques *et al.* (2012), afirma que es posible que aumentando la progesterona no se puedan mejorar los porcentajes de gestación cuando éstos están ya cercanos al 60%.

Tal como hemos señalado anteriormente, con la finalidad de aumentar igualmente el porcentaje de gestación en receptoras de embriones bovinos, se han utilizado distintos protocolos con gonadotropina coriónica equina en protocolos de trasplante de embriones a tiempo fijo (Fuentes and de la Fuente, 1997; Santos *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2004; Baruselli *et al.*, 2005b; Fuentes and de la Fuente, 2007). El uso de esta hormona se basa en que se vincula a los receptores foliculares de FSH y de LH, y a los receptores de LH del CL, creando de esta forma condiciones de crecimiento folicular, ovulación y luteinización (Baruselli *et al.*, 2003b); Pero su acción predominante es de FSH, lo que daría a lugar a la formación de cuerpos lúteos accesorios característicos de la yegua gestante (Bousfield and Butnev, 2001).

La aplicación de eCG en el momento esperado de una nueva onda de crecimiento folicular, ha demostrado ser eficaz para producir superovulación y/o desarrollo de un folículo dominante de mayor diámetro, determinando de esta forma un mayor número de cuerpos lúteos (Fuentes and de la Fuente, 1997) o un CL grande (Baruselli *et al.*, 2005b). Esto iría acompañado de mayores concentraciones plasmáticas de P₄ y mejores porcentajes de aprovechamiento y gestación frente a tratamientos sin aplicación de esta hormona (Tribulo *et al.*, 2002).

Por otra parte, señalar también que se ha probado otra forma de incrementar la P₄ plasmática en búfalas y vacas, utilizando tratamientos con GnRH, LH, hCG (esta última producida en el sincitio trofoblasto de las mujeres gestantes) y dispositivos de liberación lenta de P₄ aplicados el día 7 del ciclo estral (Campanile *et al.*, 2007). En este sentido, la hCG se ha aplicado en tratamientos de sincronización el día 6, obteniéndose porcentajes de gestación más altas frente a grupos sin la aplicación de esta hormona. Estos resultados igualmente sugieren que la hCG, (la cual tiene acción LH), dependiendo del día de su aplicación, induce la ovulación y la formación de cuerpos lúteos accesorios, los cuales incrementan la concentración de P₄ plasmática y los porcentajes de gestación en hembras receptoras de embriones bovinos (Baruselli *et al.*, 2005b). En cambio, Greve *et al.* (1982); Looney *et al.* (1984); Massey *et al.* (1983); Sreenan and Diskins (1987), usaron de hCG en receptoras después de ser transferidas, con dosis que variaron de entre 1.000 y 5.000 UI, administradas en un solo momento o en un período comprendido entre el día 7 (momento de la transferencia) y el día 35 y en ninguno de estos estudios, se lograron mejorar los porcentajes de gestación de las hembras receptoras de embriones.

Respecto al uso de GnRH, señalar que Ellington *et al.* (1991), llegaron a emplear la hormona liberadora de gonadotropinas o alguno de sus análogos, administrando 8 mg de buserelina en el momento de la transferencia o entre los días 4 y 7 postransferencia, sin embargo, los porcentajes de gestación logrados (72% y 66%, respectivamente), no difirieron significativamente del grupo control (68%).



A pesar de ello, nosotros pensamos, tal como apunta Binelli *et al.* (2001), que otro aspecto importante a tener en cuenta es conseguir niveles bajos de E₂, en el período crítico del reconocimiento maternal de la gestación (días 15-17), para inhibir o retrasar la luteolisis, ya que el E₂ puede estimular la secreción de PGF_{2α} y por este motivo, se plantea el uso de GnRH el día de la transferencia (día 7) y en el día 17 postransferencia, ya que con la primera GnRH, día 7, se provoca la ovulación del folículo dominante y la aparición de una nueva onda de crecimiento folicular y con la segunda GnRH, la ovulación del nuevo folículo dominante y se consigue de este modo, niveles bajos de E₂ en el período crítico, lo que llevaría a aumentar los porcentajes de gestación en hembras receptoras de embriones.

II.11.2.- Evitar la producción de prostaglandinas por el endometrio

Esta es otra estrategia para intentar incrementar los porcentajes de gestación en receptoras dentro de programas de TE, ya que la producción de prostaglandinas por el endometrio, en el momento de la transferencia, pueden afectar negativamente al desarrollo del embrión (Schrick, *et al.*, 2000) o en el período crítico del RMG (Binelli *et al.*, 2001).

En el ganado vacuno, el CL debe permanecer durante todo el período de gestación para mantener la gestación (Niswender *et al.*, 2000). Para que esto ocurra, debe prevenirse la luteolisis. La sustancia luteolítica del útero en el ganado, es la PGF_{2α} (McCracken *et al.*, 1999). La prostaglandina PGF_{2α} puede causar aborto a través de la regresión del CL, o a través de un efecto directo sobre el embrión en desarrollo.

Aparte de poder liberarse durante su ciclo natural, la PGF_{2α} puede liberarse en casos de enfermedad, por inyecciones de oxitocina (cuyo uso es frecuente en granjas de leche en el momento del ordeño de las vacas), o por manipulación uterina (Ferguson, 1941; Lemaster *et al.*, 1999; Vanroose *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2000). El período de tiempo de mayor sensibilidad del embrión a la liberación PGF_{2α} parece estar en los días 5 al 8 después de la concepción, mientras que el CL es más sensible entre los días 15 al 18.

La prevención de la liberación de prostaglandinas se puede lograr a través de la alimentación, ciertos ácidos grasos polinsaturados, inhiben la liberación de PGF_{2α} por el útero: Thatcher *et al.* (1994), en un ensayo *in vitro*, identifica al ácido linoleico como un inhibidor de la síntesis de prostaglandina por el endometrio.

La administración de antiinflamatorios no esteroideos, como el flunixin meglumine (FM), actúa impidiendo la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas implicadas en la formación de prostaglandinas (Smith *et al.*, 2000). En el ganado vacuno, el tratamiento de FM ha aumentado la duración del ciclo y ha disminuido la producción de PGF_{2α} (Odensvik and Fredrickson, 1993; Odensvik *et al.* 1998). Además, la administración de flunixin meglumine impide abortos causados por la inyección de oxitocina en el día 5-8 después de la fecundación y ha mejorado los porcentajes de gestación de las vacas que recibieron embriones en el día 7 después del estro (Lemaster *et al.*, 1999 y Schrick *et al.*, 2000).

En este sentido, Fuentes and de la Fuente (2001), también consiguen con la aplicación de 10 cc de flunixin meglumine aplicado en el momento de la transferencia, mejores porcentajes de gestación, sobre todo cuando hay una excesiva manipulación.



Scenna *et al.* (2005), asocia la calidad y el desarrollo del embrión con las tasas de preñez cuando compararon el grupo control contra el grupo experimental (tratado con un inhibidor de síntesis de prostaglandinas). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) con mejores porcentajes de gestación en el grupo experimental. Vale la pena resaltar que el modelo estadístico aparentemente no comparó las tasas de gestación dentro de cada grupo para calidad o desarrollo del embrión, pero se observa que la gestación tuvo la tendencia a ser mayor para embriones de calidad 1: 64,5% control (322/499) y 66,9% experimental (572/856), comparados con los embriones de calidad 2: 53,5% (122/228 control) y 64,2% (224/349 experimental).

McNaughtan (2004), transfiere embriones congelados-descongelados a receptoras mestizas (Hereford x Angus) con un CL bueno, con buena condición corporal y un buen desarrollo del aparato reproductor. En el grupo control, obtiene un 45% de gestaciones (75/165), el grupo experimental recibe 10 ml (500 mg) de FM inmediatamente antes de la transferencia; obtiene un 50% de gestaciones (81/161), no encontrando diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre el grupo control y el grupo tratado con FM.

II.11.3.- Otras vías alternativas utilizadas para incrementar los porcentajes de gestación

Block *et al.* (2009), estudiando cambios en los componentes del cultivo para producir embriones *in vitro* Holstein, evaluó el efecto de añadir el glicosaminoglicano (ácido hialurónico), en el medio de cultivo SOF (fluido oviductual sintético) en diferentes concentraciones (0; 0,1; 0,5 o 1 mg/ml) durante el proceso de producción de los embriones; sobre los embriones transferidos, analizaron las diferencias en los porcentajes de gestación dependiendo del estadio de desarrollo al momento de la transferencia. Encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) para la gestación con mórulas: 18,5% (15/81, control) y 28,6% (20/70, ácido hialurónico), comparada con la de blastocistos expandidos: 38,3% (31/81, control) y 29,5% (23/78, ácido hialurónico).

Por último señalar que Heyman *et al.* (1987), llegaron a emplear vesículas trofoblásticas, las cuales se transfieren conjuntamente con el embrión, con la finalidad de contribuir al mantenimiento de la fase luteal en la receptora, y mejorar la intensidad y la calidad de las señales embrionarias. Transfirieron un embrión congelado y dos vesículas trofoblásticas congeladas simultáneamente. A los 45 días de gestación, encontraron que la tasa de preñez de estas receptoras (73%) fue mayor que la del grupo control (43%).

III.- MATERIAL Y MÉTODOS



III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- Características de las explotaciones y de los animales

Este estudio se ha realizado durante un periodo de 25 años (1989-2014), en ganado vacuno de raza Frisona pertenecientes a 193 explotaciones distribuidas geográficamente en 15 provincias de España, dentro de un programa comercial de TE de Aberekin S.A.; la figura, muestra las provincias donde se localizan geográficamente estas explotaciones.

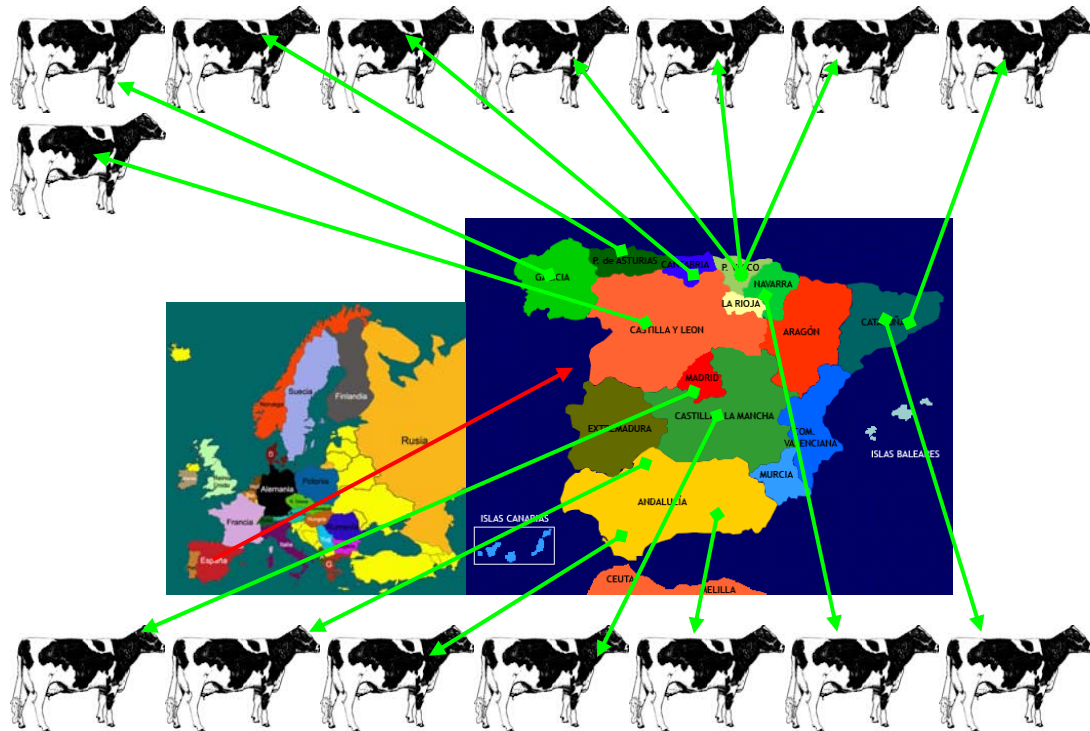


Figura 33: Mapa geográfico de España. Localización de las explotaciones estudiadas.

En cuanto a las características ambientales de la zona de trabajo, la diversidad climática de España es muy grande, por lo que nos hemos adaptado a las circunstancias de cada zona evitando trabajar en los meses de más calor, sobre todo en el centro y sur de España, por el efecto negativo del estrés calórico sobre la fertilidad, más notorio en las hembras donantes que en las receptoras.

Todas las ganaderías integrantes de este estudio están inscritas en CONAFE (entidad de ámbito estatal integrada por las Federaciones de las Comunidades Autónomas, cuyos objetivos principales tienen como denominador común el desarrollo de programas orientados a la mejora y selección de la raza Frisona) y sus vacas están sometidas a control oficial de rendimiento lechero.

En CONAFE, la producción láctea media por vaca ha aumentado considerablemente durante estos 25 años así, se ha pasado de 91.334 lactaciones validas en 1990 a 351.830 en 2014, con una producción media en lactación estándar a 305 días de 6.587 Kg. para 1990 y 9.736 Kg. para 2014 y en lactación natural de 6.930 Kg. en 1990 a 11.425 Kg.



en 2014 con una duración media de lactación de 318 días en 1990 y 370 días en 2014 y una producción diaria que ha pasado de 21,8 Kg/vaca/día en 1990 a 30,9 Kg/vaca/día de media en el 2014 (CONAFE 2015).

Los rebaños son de régimen intensivo, con sistema de estabulación permanente, contando con patio de cama caliente o con cubículos y la mayoría de las ganaderías son familiares, con un censo medio que ha ido aumentando a lo largo de los años, situándose en 2014 en 107 hembras totales (71 vacas de ordeño, 36 terneras/novillas), aunque con una gran variedad de dimensiones; esto implica cambios importantes como son: más y mejores instalaciones, nuevas máquinas de ordeño, robots de ordeño, mejora de la alimentación, del manejo del ganado, además del desarrollo de programas con el objetivo de mejorar la rentabilidad de la ganadería: programas de control de la reproducción, control de mamitis y calidad de leche, control de máquinas de ordeño, nutrición, podología, programas de acoplamiento informatizados con el objetivo de maximizar la genética y programas gestión técnico-económica de la ganadería.

La alimentación de las explotaciones es a base de raciones completas mezcladas, con carro mezclador (**UNIFEED**), elaboradas y equilibradas por el nutrólogo especialista.

Las explotaciones que integran este estudio están sometidas una vez al año a Campañas Oficiales de Saneamiento Ganadero siendo el estatus sanitario de todas ellas de oficialmente indemnes de Tuberculosis, oficialmente indemnes a Brucelosis, indemnes a Leucosis y libres de Perineumonía, así mismo en el último año la ganadería no ha tenido ningún caso clínico de IBR y las donantes y receptoras están sanas en el momento de la recolección de los embriones y de la transferencia, respectivamente.

Como somos un equipo de TE autorizado por la UE para intercambio intracomunitario, inicialmente con el código E0101 y posteriormente con el código ES15ET01B; se ha cumplido con la normativa europea que se recoge en la Directiva 89/556/CEE y la normativa nacional señalada en el Real Decreto 855/1992 que hace especial referencia a la sanidad de las ganaderías, donantes y embriones así como la trazabilidad de estos, a los medios necesarios y a los procedimientos de trabajo.

Todas las ganaderías disponen de un programa de control de la reproducción realizado por equipos de veterinarios independientes o por veterinarios contratados o subcontratados por la asociación de ganaderos de la raza en su provincia o en su comunidad autónoma, o formando parte de una cooperativa.

En este trabajo se han realizado 1.838 superovulaciones, de hembras de raza Frisona sanas, sin problemas patológicos que pudieran afectar negativamente a los resultados, de las cuales 846 (46,3%) son vacas en lactación, 922 (50,16%) novillas, y 70 (3,81%) vacas secas con una tasa global de 5,36 embriones transferibles por superovulación.

El presente estudio se ha realizado a partir de 4.898 transferencias realizadas en novillas Frisonas entre 14 y 17 meses con embriones procedentes de donantes (hembras y semen) de raza Frisona, y en el que para evitar la variabilidad inherente a la calidad del embrión, se han elegido solamente los embriones que tenían calidad 1 en el momento previo a la transferencia en fresco o a la congelación, obteniéndose un porcentaje medio de gestación en las hembras receptoras del 59,19%.



Los diagnósticos de gestación inicialmente se realizaron por palpación rectal a partir del día 30 posttransferencia. Cuando se impone el uso del ecógrafo, los equipos de los programas de control de la reproducción realizan los diagnósticos alrededor de los 30 días después del celo de la receptora.

III.2.- Metodología de trabajo

III.2.1.- Donantes

En la selección de las donantes, las características genéticas relacionadas con la rentabilidad deberían ser las que determinan si una hembra va a ser una donante. Para aquellos ganaderos que colaboran o forman parte de un programa de mejora genética, las características genéticas y la intensidad de selección están predeterminadas por el programa; esto no implica que se realicen superovulaciones a animales que tienen características diferentes, ya sea en ganaderos que están dentro de un programa de mejora genética o fuera de él; en estos casos, es el ganadero quien decide sobre la donante.

Cuando la donante es una novilla, hemos tenido en cuenta su edad, utilizando las comprendidas entre 14 y 17 meses, con un buen desarrollo corporal, un correcto desarrollo de su aparato reproductor, con ciclicidad ovárica regular, y ausencia de procesos patológicos.

Si la donante es una vaca, existen muchos factores importantes que se pueden tener en cuenta para decidir la superovulación. La ausencia de procesos patológicos, tanto reproductivos como de cualquier otra naturaleza y la actividad ovárica regular son los dos primeros aspectos que de forma categórica incluyen o excluyen a la donante para la superovulación en ese momento. Otros aspectos de suma importancia son el tiempo transcurrido desde el parto, la condición corporal, así como el nivel de producción; las donantes tienen que estar ganando peso, con una condición corporal aconsejable, mínimo de 2,5 (Ferguson *et al* 1994) y con una producción aconsejable inferior a 50Kg de leche al día; esto nos conduce a intervalos parto-superovulación medios de 4 meses y producciones en el momento del inicio del protocolo de superovulación, de 36,34 kg de leche. Otros aspectos a valorar pero con una importancia relativa, son el número de partos y el número de superovulaciones consecutivas sin que haya mediado una gestación.

Cuando la vaca que superovulamos es una vaca seca, además de comprobar la ausencia de cualquier patología, tenemos en cuenta que en el periodo seco, el principal problema que se nos puede presentar es que la falta de producción láctea, lleve a un engrasamiento excesivo del animal, disminuyendo la efectividad del tratamiento y la calidad de los embriones obtenidos, por lo que comprobamos que la hembra presente un nivel óptimo de puntuación en su condición corporal: 3 en la escala del 1 al 5 (de la Fuente, 2009).

Como norma general, las donantes, un mes antes del inicio de la superovulación, no podrán tener ningún proceso patológico, no podrán ser vacunadas ni tener cambios de manejo o alimentación; cualquier alteración que afecte a la rutina normal de la donante y que se presente en ese período, puede representar un retraso en el inicio de la superovulación.



III.2.2.- Tratamiento de superovulación

La superovulación de una donante consiste en la administración de gonadotropinas exógenas, FSH/LH durante 4 o 5 días y 8 o 10 inyecciones a.m./p.m., en dosis decrecientes, con el objetivo de provocar una múltiple ovulación (Foto 27).

El inicio del tratamiento depende del protocolo a usar; así, en nuestros inicios usamos los protocolos tradicionales en los que la administración de la FSH/LH se inicia a los 9-10 días después de un celo natural o inducido (Lindsell *et al.*, 1986a), cerca del momento de la emergencia de la segunda onda folicular, (Ginther *et al.*, 1989a).

Con el mayor conocimiento de la dinámica folicular en el año 1996 empezamos a usar protocolos que combinan la inserción de un dispositivo vaginal de P₄ (PRID[®]) el día cero y la administración i.m. de 5 mg de E₂ (Estilbo Vitaminado[®]) y 100 mg i.m. de P₄, (Progesterona E[®]) el día cero o uno, de esta manera se sincroniza eficazmente la onda folicular, independientemente del momento del ciclo en que la donante se encuentre, provocando la regresión de la onda folicular en curso y la emergencia de una nueva onda a los 4,3 días de media, por lo que el día 4 después de la administración de E₂ iniciamos la superovulación con FSH/LH, (Pluset[®] o Folltropin[®]), (Adams, 1994; Fuentes and de la Fuente, 2000; Bó *et al.*, 2002); para inducir la luteolisis se emplea PGF_{2α} (2 ml de Estrumate[®]) con la 5^a y 6^a inyección de FSH/LH; el dispositivo de progesterona vaginal, se retira con la segunda PGF_{2α} y a las 36 horas inyectamos GnRH (5 ml de Fertagyl[®]) e inseminamos a las 12 y 24 horas de la aplicación de GnRH; la recolección se realiza 7 días más tarde de la primera inseminación artificial.

La prohibición en la UE del uso de progesteronas inyectables, estrógenos y sus derivados, por la Directiva 2003/74/CE y el Real Decreto 2178/2004, por la posibilidad de su inclusión en la cadena alimenticia humana, obligó a diseñar nuevos protocolos cuyo objetivo es obtener un folículo dominante capaz de ovular con 100 µg de GnRH, la nueva onda folicular emergente aparece entre las 24 y 48 horas (Macmillian *et al.*, 1994; Pursley *et al.*, 1995) y se puede iniciar la superovulación a las 36 horas de la aplicación de la GnRH. A partir de ese momento, usamos dos protocolos que a continuación se describen:

1. Con la inserción el día cero de un dispositivo vaginal de P₄ (PRID[®]) y una PGF_{2α} (2 ml de Estrumate[®] i.m.), y 5 días más tarde otra PGF_{2α} (2 ml de Estrumate[®] i.m.), obtenemos un folículo dominante y 36 horas después de la segunda PGF_{2α}, inducimos la ovulación del folículo dominante con GnRH (5ml de Fertagyl[®] i.m.); el tratamiento con FSH/LH (Pluset[®] o Folltropin[®]), se inicia 36 horas después de la administración de la GnRH; en estos protocolos la FSH/LH normalmente se aplica por la organización del trabajo durante 5 días, en 10 inyecciones a.m./p.m.; para provocar la luteolisis, se emplean dos PGF_{2α} (2 ml de Estrumate[®] i.m.), con la 9^a y 10^a inyección de FSH/LH; el dispositivo de P₄ vaginal, se retira con la segunda PGF_{2α} y a las 24 horas inyectamos GnRH (5 ml de Fertagyl[®] i.m.) para sincronizar lo mejor posible las ovulaciones e inseminamos a las 12 y 24 horas de la aplicación de la última GnRH; la recolección se realiza 7 días más tarde de la primera inseminación artificial. (Bo *et al.*, 2010; Fuentes and de la Fuente, 2000).



2. Otro tratamiento usado por nosotros consiste en la aplicación de un dispositivo vaginal de P₄ (CIDR[®]) en el día cero por la mañana, dos días después por la tarde (60 horas), administramos GnRH (5ml de Fertagyl[®] i.m.) y a las 36 horas, iniciamos un tratamiento con FSH/LH (Pluset[®] o Folltropin[®]), a.m./p.m. en dosis decrecientes, (Hinshaw, 2010), durante 5 días, (10 inyecciones); para provocar la luteolisis, se emplean dos PGF_{2α}, (2ml Estrumate[®] i.m.) con la 9^a y 10^a inyección de FSH/LH; el dispositivo de P₄ vaginal, se retira con la segunda PGF_{2α} y a las 24 horas inyectamos GnRH (5ml de Fertagyl[®] i.m.) para sincronizar lo mejor posible las ovulaciones, e inseminamos a las 12 y 24 horas de la aplicación de la última GnRH; la recolección se realiza 7 días más tarde de la primera inseminación artificial.

III.2.3.- Hormonas utilizadas en la superovulación

- Hormona Folículo estimulante y hormona luteinizante (FSH/LH). Hemos usado los siguientes preparados comerciales de FSH/LH:
 - FSH-P[®] (Shering): Origen porcino. No existe actualmente.
 - PLUSET[®] (Calier): Origen porcino. Autorizada en España y en la UE Relación 1:1 entre FSH/LH. El envase contiene 2 frascos con 500 U.I. de FSH y 500 U.I. de LH cada uno. Envase de 20 ml de disolvente.
 - FOLLTROPIN[®] (Vetoquinol). Origen porcino. Autorizada en España y en algunos países de la UE pero no en todos. FSH purificada a la que se le ha extraído un 75-80% de la LH. El envase contiene 700 U.I. de FSH, equivalentes a 400 mg NIH-FSH-P y un envase con 20 ml de disolvente.
- Otras hormonas.
 - Dispositivos vaginales de progesterona:
 - PRID[®] con cápsula de Benzoato de Estradiol (Ceva Salud Animal). No autorizado su uso actualmente por la Directiva 2003/74/CE y Real Decreto 2178/2004.
 - PRID Alfa o Delta[®] sin la cápsula de benzoato de Estradiol (Ceva Salud Animal).
 - CIDR[®] 1,38 dispositivo vaginal para vacas (Zoetis Spain S.L.U.).
 - PROGESTERONA-E[®] (Neosán). Progesterona inyectable, contiene 20 mg de progesterona por ml y 60 mg de vitamina E. No autorizado su uso actualmente por la Directiva 2003/74/CE y Real Decreto 2178/2004.
 - ESTRUMATE[®] (MSD Animal Health). Análogo sintético en solución inyectable de prostaglandina PGF_{2α}.
 - FERTAGYL[®], (MSD Animal Health). Hormona liberadora de gonadotropinas, (GnRH), en suspensión inyectable; Contiene 0,1mg de Gonadorelina (acetato) dosis recomendada entre 0,25 mg (2,5 ml) y 0,5 mg (5 ml). No informa de la equivalencia con GnRH.
 - ESLTILBO VITAMINADO[®], (Syva). Contiene 50 mg de 17β Estradiol, 125.000 U.I. de vitamina A, 50 mg de vitamina E y 10 ml de excipiente. No autorizado su uso actualmente por la Directiva 2003/74/CE y Real Decreto 2178/2004.



Foto 27: Ovarios superovulados día 8.

III.2.4.- Técnica de recolección de los embriones

La recolección se realiza siete días después de la primera inseminación artificial, vía transvaginal mediante un sondaje profundo utilizando una sonda Nustadt Aisch/Rüsh o sondas desechables, las sondas están protegidas en su paso por la vagina por una funda sanitaria que se rompe en la cervix.

La recolección se realiza en granja en un laboratorio móvil que cumple con la Directiva 89/556/CEE y con el Real Decreto 855/1992.

El lavado de los cuernos uterinos se realiza introduciendo repetidamente pequeñas cantidades, entre 30 cc y 50 cc en las vacas y entre 20 cc y 35 cc en novillas, hasta completar unos 800 cc de volumen total introducido por cuerno uterino, de Dubelcco Fosfato Bufer Salino (PBS) (BioLife™ “Advantage” Complete Flush Medium; Agtech); el PBS es introducido con jeringa de 60 cc y un sistema de tuberías en “Y” con válvula antirreflujo; una vez introducido se extrae el PBS por gravedad y los embriones se recogen en un filtro Em-Con® (Immuno Systems, Inc.), con 75 µ de poro (Fotos 28, 29 y 30).

El PBS que se encuentra en el filtro y contiene los embriones, se deposita en una placa petri cuadrículada (Foto 30); la búsqueda de los embriones se realiza, mediante una lupa estereoscópica con base diascópica, a 10 aumentos e inmediatamente que se van localizando, se introducen con una micropipeta (Foto 30), en otra placa de petri de 4 pocillos Nunc® (Foto 30) con medio de mantenimiento PBS+0,4% BSA (BioLife™ Holding & Transfer Medium; Agtech), cuando se han localizado todos, se tratan y se clasifican en función de su estado de desarrollo y su calidad según el manual de la Sociedad Internacional de Trasplante de Embriones (IETS), 3ª edición (Stringfellow D.A.; Siedel S.M. 2000); en este momento los embriones pueden transferirse en fresco a receptoras previamente sincronizadas con la donante, o se pueden congelar para su posterior transferencia.

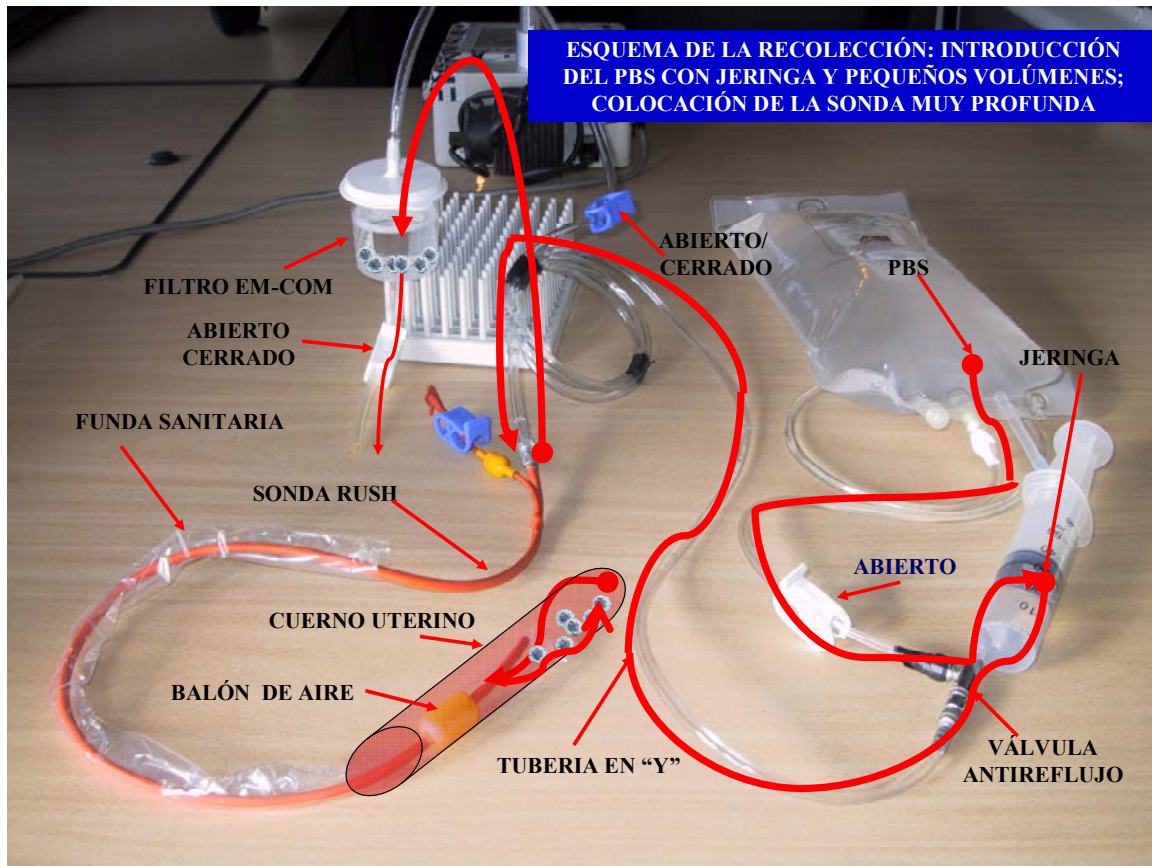


Foto 28: Recolección de embriones con pequeños volúmenes.

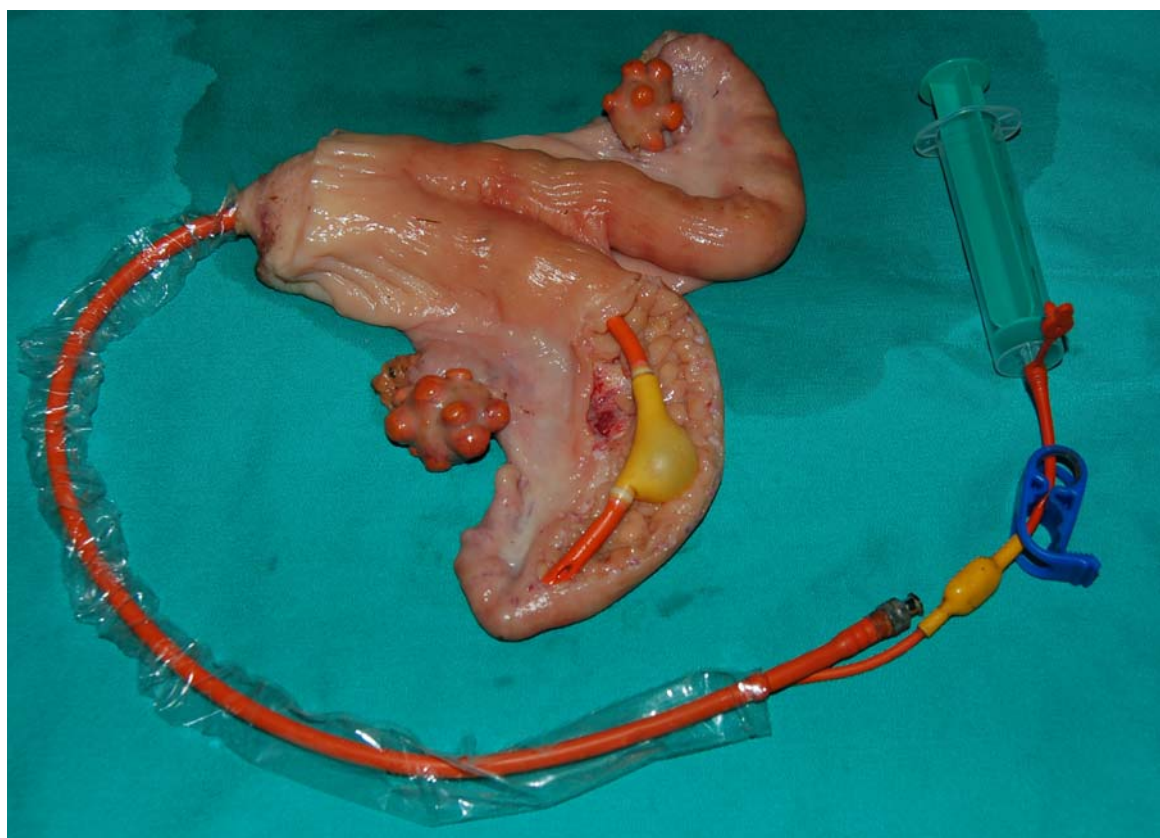


Foto 29: Recolección de embriones con sonda Rüş y pequeños volúmenes



Foto 30: Set de tuberías, filtro para embriones, placas de petri para búsqueda, clasificación y lavado de los embriones, micropipeta para manejar los embriones.

III.2.5.- Tratamiento de los embriones: determinación del estado de desarrollo y la calidad

Para la determinación del estado de desarrollo y la calidad; se siguen las directrices de la IETS y la Directiva 89/556/CEE.

Los embriones una vez localizados e introducidos en medio de mantenimiento, se separan los que son transferibles del resto, éstos deben tener la membrana pelúcida intacta; se examinan con lupa estereoscópica a 50 aumentos, por toda su superficie para quitar cualquier mucosidad o suciedad adherida y se procede al lavado (como máximo 10 embriones de una vez), diez lavados con un catéter estéril para fecundación *in vitro* (IVF Catheter, Agtech) (Foto 31), que se une a una jeringa de insulina y se cambia en cada paso; para este proceso utilizamos placas estériles de 12 pocillos (Fotos 30 y 31). Si se requiere el tratamiento con tripsina, se realizan dos lavados en PBS con tripsina al 0,25%; de 30 segundos cada lavado; para inactivar la tripsina se realizan 5 lavados adicionales en medio de mantenimiento con 0,4% de BSA. Solo serán aptos aquellos embriones transferibles con la membrana pelúcida intacta y sin suciedad adherida a la membrana pelúcida (Figura 34).

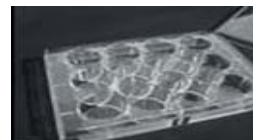


Foto 31: Catéter IVF con jeringa para lavado de embriones y placa de 12 pocillos

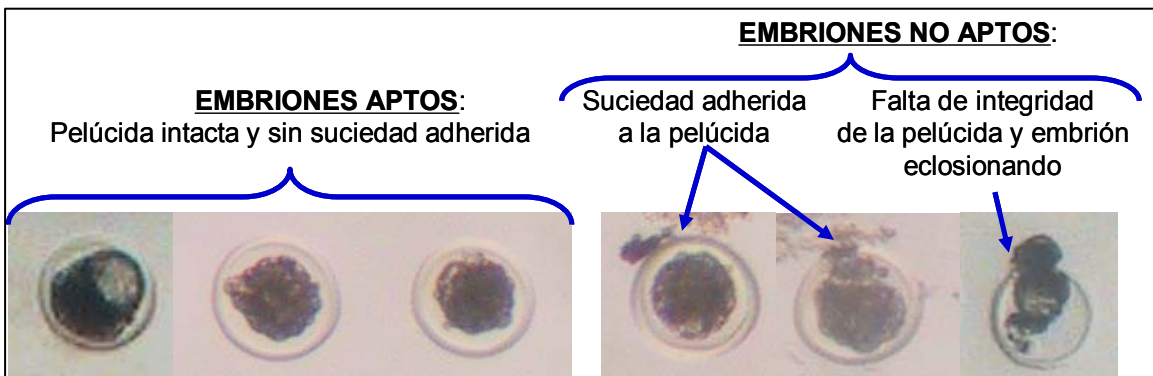


Figura 34: Embriones aptos y no aptos en función de la integridad de la membrana pelúcida y de la suciedad adherida a ésta.



Para determinar el estado de desarrollo del embrión, tenemos en cuenta las especificaciones y codificaciones que recomienda la IETS.

La recolección de los embriones se realiza el día 7 por lo que lo normal es encontrarse mórulas compactadas, jóvenes blastocistos y blastocistos; excepcionalmente es posible encontrar mórulas sin compactar y blastocistos expandidos (Figura 35).

Código IETS	ESTADO DE DESARROLLO	DÍAS
1	No fecundado	
2	De 2 a 16 células	2-4
3	Mórula	5-6
4	Mórula Compactada	6
5	Joven Blastocisto	6.7
6	Blastocisto	7-8
7	Blastocisto Expandido	8-9
8	Blastocisto Eclosionado	9-10
9	Blastocisto Eclosionado Expandido	9-10

Presentación muy rara:
Podemos encontrarlas cuando hay ovulaciones tardías y o cuando lavamos un poco más pronto de lo habitual.

Estructuras Normales:
Cuando se colecta en el día 7 post inseminación.

Poco frecuente:
Es más frecuente cuando se insemina muy pronto y se lava un poco tarde.

Figura 35: Estado de desarrollo del embrión y códigos según la IETS.

La determinación de la calidad del embrión se realiza siguiendo las recomendaciones y la codificación de la IETS; pero es indudable que existe una cierta subjetividad inherente al profesional que la realiza y su experiencia. La calidad del embrión es un factor de variabilidad que influye de forma significativa en los porcentajes de gestación, (Hasler, 2001). Los aspectos más importantes que tenemos en cuenta para determinar la calidad del embrión son: (Figura 36) (Foto 32):

1. El estado de desarrollo del embrión tiene que estar en concordancia con el teórico en el día de la recolección.
2. Forma general, la esfericidad e integridad de la zona pelúcida, ésta debe ser lisa, uniforme y no presentar ningún tipo de irregularidad.
3. El estado de agregación de las células, las diferencias de tamaño y la presencia de células separadas del embrión, en el espacio perivitelino.
4. La integridad del trofoblasto.



CÓDIGO I.E.T.S.	ESTADO	OBSERVACIONES
1	EXCELENTES	No hay ninguna imperfección. La IETS permite la existencia de unas pocas células separadas del embrión pero como mínimo el 85% del material celular debe permanecer intacto, dentro de la masa embrionaria.
2	REGULARES	Algunas células separadas del embrión, en el espacio perivitelino, por lo menos el 50% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria. Irregularidades en la forma y el tamaño Bueno para congelar, mejor transferir en fresco.
3	MALOS	Abundantes células separadas del embrión, en el espacio perivitelino, por lo menos el 25% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria Irregularidades en la forma y diferencias de tamaño de las células. No apto para congelar. Transferencia en fresco.
4	MUERTOS / DEGENERADOS	Ovocitos o embriones degenerados, con muy pocas células No hay concordancia con el estado de desarrollo teórico del embrión.

Figura 36: Calidad del embrión y códigos I.E.T.S.

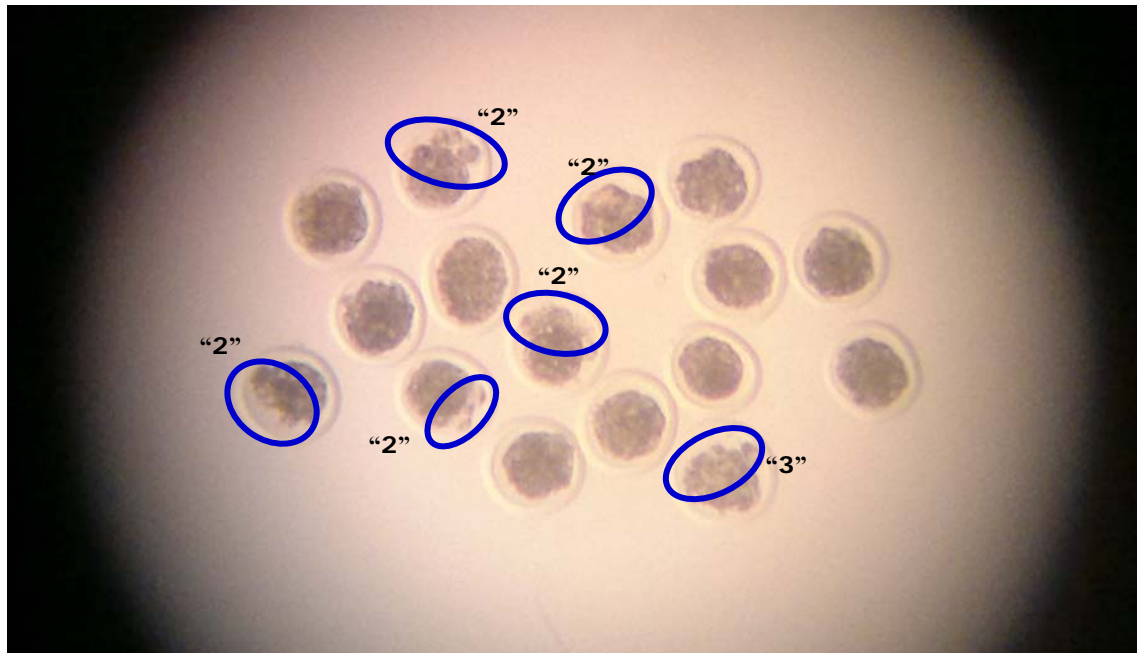


Foto 32: Embriones de distinta calidad. Los no marcados son calidad 1.

III.2.6.- Congelación de embriones y crioprotectores utilizados

La congelación de los embriones nos permite conservarlos indefinidamente con porcentajes de supervivencia posdescongelación superiores al 95% y porcentajes de



gestación esperados superiores al 50% (Fuentes and de la Fuente 2011), por lo que es una técnica de vital importancia, ya que no siempre hay disponibles suficientes receptoras para transferir en fresco y nos permite guardarlos para transferirlos cuando dispongamos de receptoras, además, la congelación se hace imprescindible para el comercio de embriones. Según las estadísticas de la AETE en 2014, el 51,77% de los embriones, producidos *in vivo*, que se transfirieron eran congelados (AETE 2014), mientras que en el ámbito de la IETS, en 2013 se congelaron el 58,9% de los embriones producidos *in vivo*.

Al comienzo de nuestra actividad en trasplante de embriones el crioprotector disponible era el glicerol; en febrero de 1995 empezamos a usar etilenglicol como crioprotector pero no en todas las congelaciones; a la vista de los resultados obtenidos, a partir de febrero de 1997, solo usamos etilenglicol.

El procedimiento para añadir el crioprotector al embrión es el mismo si usamos glicerol que etilenglicol. Una vez realizados los 10 lavados y determinados que embriones se van a congelar, se establece el orden del embrión dentro de la colecta y se introducen en una solución de PBS+0,4% BSA y 10% de glicerol (BioLife™ Freeze Medium Glycerol; Agthech) o en una solución que contiene PBS+0,4% BSA + etilenglicol 1,5 molar y sacarosa 0,1 molar (BioLife™ Freeze Medium Ethylene Glycol; Agthech) durante 10 minutos; inmediatamente se introducen en las pajuelas de 0,25 ml que se cierran con un tapón conector para conectar la pajuela que lleva el embrión con una de 0,50 ml que sirve de identificación y se colocan en posición vertical con el tapón conector hacia arriba.

Para introducir el embrión dentro de la pajuela se utiliza un microaspirador (foto 33); se coloca la pajuela en el microaspirador por la parte del tapón de algodón; se aspira un poco de medio de congelación y seguidamente un poco de aire de manera que se forma una pequeña cámara de aire, se aspira más medio de congelación con el embrión y otro poco de aire, de esta forma, tenemos al embrión en medio de la pajuela, separado del resto por dos burbujas de aire; se aspira más medio de congelación y se pone el tapón que cierra la pajuela y la conecta con otra pajuela de 0,50 cc que sirve de identificación del embrión y se colocan la pajuelas verticalmente con el tapón conector hacia arriba. (Figuras 37 y 38).



Foto 33: Dos microaspiradores diferentes para introducir los embriones en las pajuelas.

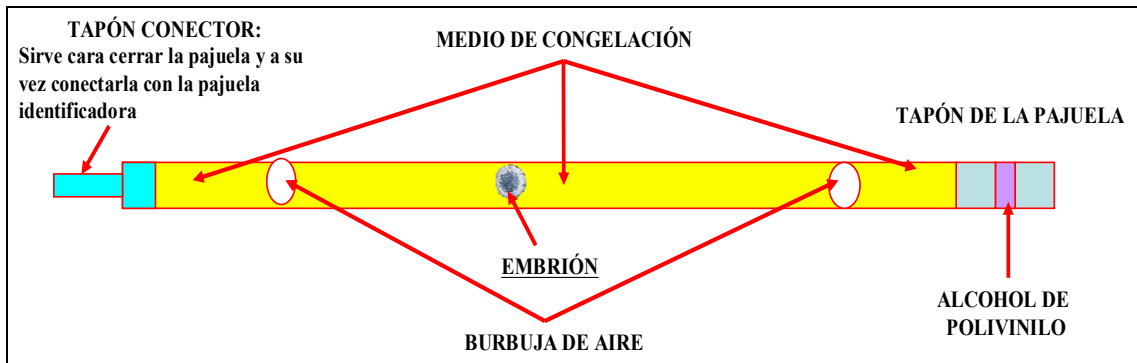


Figura 37: Empajuelado del embrión.

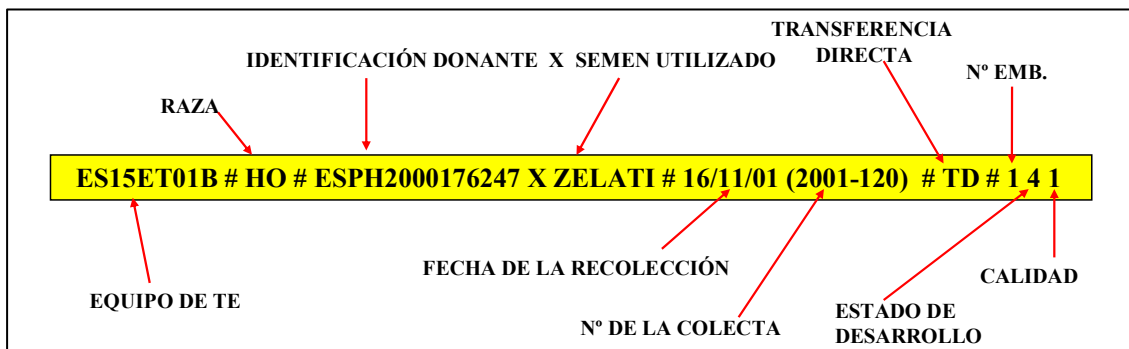


Figura 38: Identificación del embrión.

Una vez están todos los embriones empajuelados, se introducen por el orden de colecta en el biocongelador previamente programado (SY-LAB[®] modelo Cryocel 1200) (Foto 34), con la siguiente curva de congelación (Figura 39):

1. Temperatura de inicio = -7°C.
2. Estabilización = 10 minutos.
3. La inducción de cristales extracelulares se realiza con pinzas enfriadas en nitrógeno líquido tocando en la parte superior de la zona de la pajuela que contiene el embrión.
4. Estabilización = 10 minutos.
5. Velocidad de descenso de temperatura = 0,5°C/minuto.
6. Temperatura final = -35°C. En este momento se colocan los identificadores y se introducen, rápidamente los embriones en Nitrógeno líquido (-196°C).

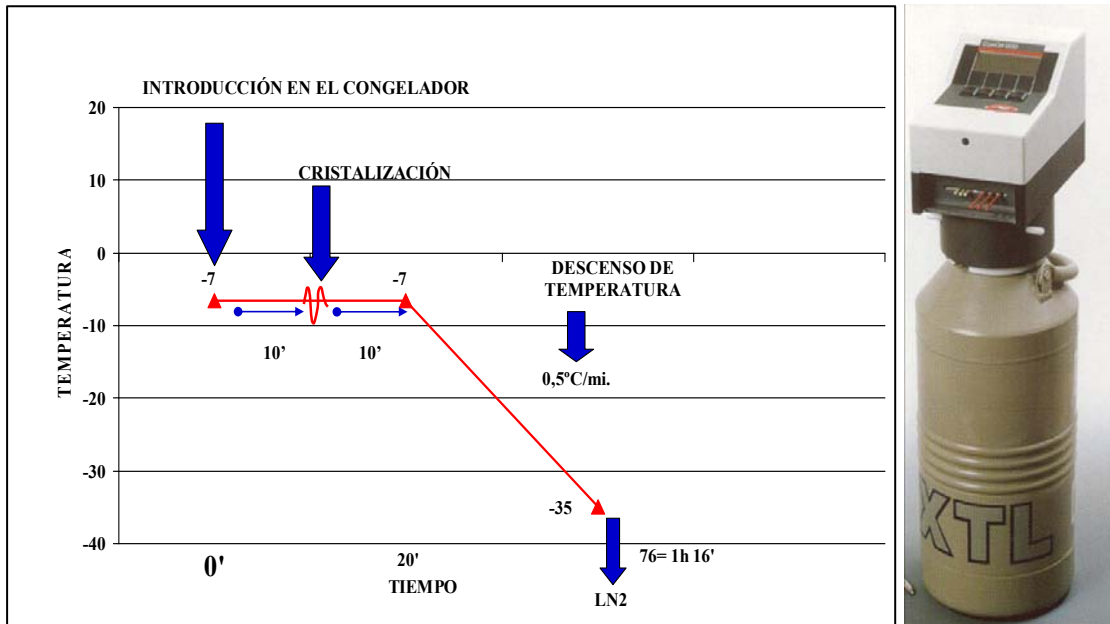


Figura 39: Curva de congelación.

Foto 34: Biocongelador

Los embriones una vez empajuelados y congelados deben ser introducidos en visotubos que ya están en nitrógeno líquido y que llevan la misma identificación que la pajuela identificadora. Los visotubos van introducidos en racks de aluminio que llevan en un extremo una chapa con la identificación de la colecta. En el caso de los embriones congelados en etilenglicol para TD, la pajuela identificadora así como la chapa que va al final del rack, deben ser de color amarillo, según las indicaciones de la IETS (Figura 40)

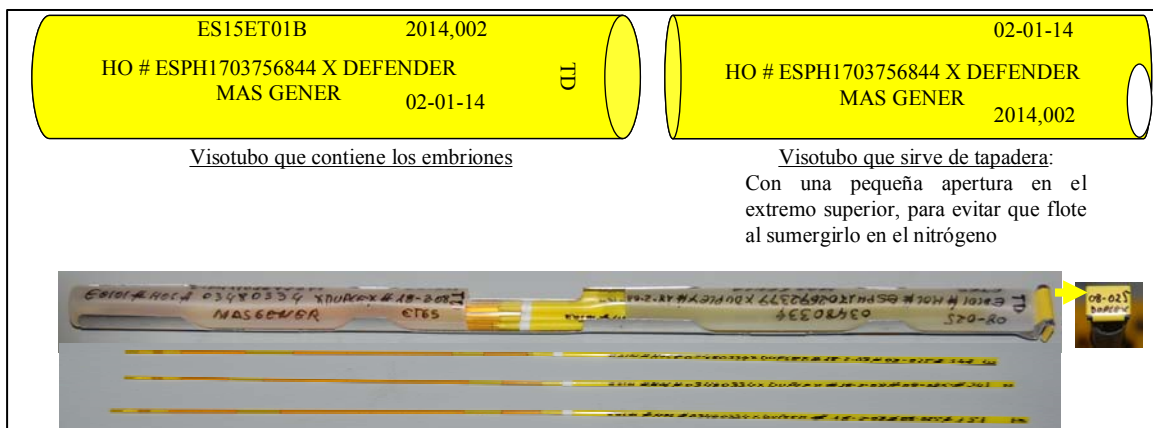


Figura 40: Almacenamiento de los embriones.

III.2.7.- Descongelación de embriones

Para evitar la variabilidad inherente a la calidad del embrión, todos los embriones transferidos fueron calidad 1, previa a la congelación, (tanto los embriones congelados en glicerol, como en etilenglicol), o a la transferencia en fresco.

El cambio de estado se realiza 10 segundos al aire y 20 segundos en agua entre 25°-30°C; a partir de este punto, la retirada del crioprotector será diferente según el crioprotector que hayamos usado.



A.- Glicerol 10%

La retirada del crioprotector la realizamos en tres pasos.

Para extraer el embrión de la pajuela, se retira el tapón conector y se corta la pajuela por el otro extremo (por la zona donde está el alcohol de polivinilo que sella la pajuela cuando se moja); introducimos un estilete de acero inoxidable y empujamos el tapón de algodón que queda, suavemente hasta que sale el embrión.

Los medios usados en los pasos 1, 2 y 3 son (BioLife™ Thaw 1, 2, 3 Plus, Agtech), ya no se fabrican.

1. Introducimos, durante 5 minutos, los embriones en un medio que contiene 6,6% de Glicerol en PBS con un 0,4% BSA y sacarosa 0,3M.
2. Introducimos, durante 5 minutos, los embriones en un medio que contiene 3,3% de Glicerol en PBS con un 0,4% BSA y sacarosa 0,3M.
3. Introducimos, durante 5 minutos, los embriones en un medio que contiene 0% de Glicerol en PBS con un 0,4% BSA y sacarosa 0,3M.
4. Introducimos, durante 5 minutos, los embriones en un medio que contiene PBS con un 0,4% BSA (BioLife™ Holding & Transfer Medium; Agtech). En este mismo medio, se introducen en las pajuelas y se transfieren.

B.- Etilenglicol 1,5M

Inmediatamente después de la descongelación, se realiza la transferencia directa, sin necesidad de extraer el crioprotector.

III.2.8.- Técnica de implantación de los embriones a la receptora

Inmediatamente después de la exploración rectal o la ecografía, realizamos una marca en la grupa de la receptora en el lado en el que se encuentra el ovario con el CL, de esta forma, se evitan errores en el momento de transferir los embriones (Foto 35); cuando se realiza la exploración rectal marcamos una dos o tres marcas dependiendo de la calidad del CL; en las ecografías solo hacemos una marca y el ganadero anota el diámetro del CL y la receptora.

En el caso de la TD, nada más marcar las receptoras aptas para la transferencia se procede a la anestesia epidural, (Foto 35), con 4 cc de hidrocloreuro de lidocaína (Xilocaina®/Anesvet®), se comprueba que la anestesia ha surtido efecto e inmediatamente se extraen del contenedor los embriones a transferir, (máximo dos o tres a la vez), se realiza la descongelación tal como se ha descrito anteriormente, se quita el tapón conector y la identificación y se introduce la pajuela en un inyector (IMV-Technologies®) (IMV) para embriones, (numerado para evitar errores) (Foto 36), se coloca la vaina (IMV-Technologies®) con punta redonda de acero y salidas laterales y sobre ésta, se coloca una funda sanitaria de plástico para evitar contaminaciones a su paso por la vagina, esta funda se rompe a la entrada de la cervix; se implanta un embrión por receptora en el cuerno ipsilateral al CL.

En el caso de los embriones congelados en glicerol, descongelamos 4 o 5 a la vez, de una o máximo dos donantes; si son de dos donantes, se descongelan por separado para



evitar confusiones. Después del último paso, se introduce cada embrión en una pajuela de 0,25 ml mediante un microaspirador, de forma idéntica a lo descrito en el empajuelado de los embriones (figura 37) con PBS y un 0,4% BSA (BioLife™ Holding & Transfer Medium; Agtech)., introducimos cada pajuela en un inyector IMV, estos están numerados para saber que embrión llevamos en cada uno y evitar errores (Foto 36), colocamos la vaina IMV con punta redonda de acero y salidas laterales, en cada inyector, y sobre esta se coloca una funda sanitaria de plástico (Foto 37), para evitar contaminaciones a su paso por la vagina, esta funda se rompe a la entrada de la cervix; se implanta un embrión por receptora en el cuerno ipsilateral al CL, previa anestesia epidural que se realiza inmediatamente antes de la transferencia de los embriones.



Foto 35: Anestesia epidural.

Cuando las receptoras están anestesiadas y los embriones preparados, previamente a la introducción del inyector en la vagina, hay que limpiar la vulva, se introduce el inyector y se opera como en una inseminación (Foto 38), la funda sanitaria se rompe justo antes de entrar en el cuello uterino, se dirige el inyector hacia el cuerno ipsilateral al CL, con mucho cuidado sin hacer daño vamos progresando poco a poco, hasta que pasamos la curvatura del cuerno, intentamos si es posible, sin exceso de manipulación progresar un poco más, y depositamos el embrión.



Foto 36: Inyectores numerados.



Foto 37: Vaina y funda sanitaria.



Foto 38: Vulva limpia e introducción del inyector.

Todas las receptoras han sido novillas Frisonas entre 14 y 17 meses sin problemas patológicos, con una correcta condición corporal y un correcto desarrollo del aparato reproductor y con actividad ovárica cíclica; es importante que sean lo más dóciles posibles, que estén acostumbradas al manejo y a entrar en los autocapturas. Como norma general, las receptoras un mes antes del inicio de la sincronización, no podrán tener ningún proceso patológico, no podrán ser vacunadas ni tener cambios de manejo o alimentación; cualquier alteración que afecte a la rutina normal de la receptora, que se presente en ese período, puede provocar un descenso de los porcentajes de gestación.



III.2.9.- Hembras receptoras

La transferencia del embrión a la receptora es el último paso de un complejo proceso que finaliza con la transferencia del embrión en fresco o la congelación del mismo, en caso de ser transferidos en otro momento a receptoras que deben estar en el mismo momento fisiológico que la donante para que los embriones, encuentren el mismo ambiente uterino al ser transferidos. Esta compleja metodología, es una sucesión de pasos, todos de vital importancia para el éxito final, la gestación, que solo depende ya de la correcta selección de la receptora y del compromiso entre receptora y embrión.

III.2.10.- Selección de las hembras receptoras

Existen factores dependientes de la receptora que pueden afectar al éxito final de la transferencia del embrión, los encontramos en la raza, el tipo de receptora, novilla o vaca (Ponsart *et al.*, 2000; Hasler, 2001); en los protocolos de sincronización, en el rebaño donde ésta se encuentra, en la detección de celos y en la determinación de la calidad del cuerpo lúteo.

Es importante trabajar con receptoras dóciles, habituadas al manejo, de la ganadería para poder establecer un protocolo apropiado a sus condiciones de manejo, que nos ofrezca el mínimo estrés posible durante el tratamiento de sincronización y en el momento de la transferencia; en condiciones de campo, es muy difícil realizar cambios en el manejo y en las rutinas de los ganaderos, por lo que somos nosotros los que tenemos que adaptarnos a su manejo.

III.2.11.- Hormonas y productos farmacológicos usados en la sincronización de las receptoras y en los tratamientos postransferencia

En los tratamientos de sincronización de receptoras y en los tratamientos postransferencia, se han utilizado las siguientes hormonas y productos farmacológicos:

- PLUSET[®] (Calier) Hormona folículo estimulante y hormona luteinizante (FSH/LH); origen porcino. Autorizada en España y en la UE Relación 1:1 entre FSH/LH. El envase contiene 2 frascos con 500 U.I. de FSH y 500 U.I. de LH cada uno. Envase de 20 ml de disolvente.
- Otras hormonas.
 - Dispositivos vaginales de progesterona:
 - PRID[®] (Ceva Salud Animal). Con cápsula de benzoato de estradiol, no autorizado su uso actualmente por la Directiva 2003/74/CE y Real Decreto 2178/2004.
 - PRID[®] Alfa o Delta (Ceva Salud Animal), sin la cápsula de benzoato de estradiol.
 - CIDR[®] 1,38 g dispositivo vaginal para vacas (Zoetis SPAIN, S.L.U.).
 - PROGESTERONA-E[®]. (Neosán), progesterona inyectable, contiene 20 mg de progesterona por ml. y 60 mg. de vitamina E. No autorizado su uso actualmente por la Directiva 2003/74/CE y Real Decreto 2178/2004.



- ESTRUMATE[®] (MSD Animal Health). Análogo sintético de prostaglandina PGF_{2α}. En solución inyectable.
 - FERTAGYL[®], (MSD Animal Health). Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), en suspensión inyectable; contiene 0,1mg de Gonadorelina (acetato) dosis recomendada entre 0,25 mg. (2,5 ml). y 0,5 mg. (5 ml.). No informa de la equivalencia con GnRH.
 - FOLIGÓN[®] (MSD Animal Health).Gonadotropina coriónica de yegua gestante, (eCG) liofilizado y disolvente para solución inyectable.
 - ESLTILBO VITAMINADO[®] (Syva). Contiene 50 mg de 17β Estradiol, 125.000 U.I. de vitamina A, 50 mg de vitamina E y 10 ml de excipiente. No autorizado su uso actualmente por la Directiva 2003/74/CE. y Real Decreto 2178/2004.
- Otros productos:
 - FINADYNE[®] (MSD Animal Health). Flunixin meglumine. Contiene 50 mg de flunixino (meglumina), 5 mg de fenol y 2,5 mg de formaldehído sulfoxilato sódico.

III.2.12.- Tratamientos de sincronización de receptoras

Un punto crítico que tiene una gran importancia en esta técnica para poder determinar el día de la transferencia, es la eficaz y fiable detección del celo que requiere tiempo y mano de obra, (recursos escasos en las explotaciones, tanto familiares como no). Los celos naturales y los inducidos por PGF_{2α} fueron muy usados al inicio de la actividad en la transferencia de embriones y siguen siendo utilizados, pero en menor medida, debido a que no son fáciles de combinar con una buena organización del trabajo. Los celos naturales aparecen de forma inesperada y el uso de prostaglandinas solas, no provocan el celo en muchos casos o presentan una gran dispersión en su aparición, dependiendo del momento del ciclo en el que se encuentra la receptora cuando se le inyecta la PGF_{2α}; esto provoca un bajo porcentaje de utilización de receptoras cuando aplicamos estos métodos de sincronización (Fuentes 2000).

Con la posibilidad del control farmacológico de la onda folicular emergente, se han descrito numerosos tratamientos de sincronización de receptoras, algunos con TETF sin necesidad de detección de celos, aspecto este importante cuando se sincronizan lotes grandes de receptoras.

Hemos utilizado tres grupos de tratamientos diferentes en la sincronización de receptoras:

Grupo 1: Sin control farmacológico de la onda folicular emergente y sin superovulación. Producen un solo CL; son **A**= celos naturales y los tratamientos tradicionales, **B**= prostaglandinas.



A: Celos naturales

No es un tratamiento de sincronización, simplemente se aprovecha un celo no inducido para transferir un embrión 7 ± 1 día después del celo (Figura 41).

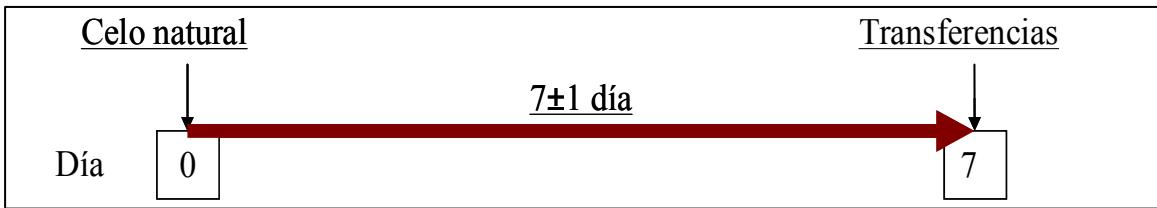


Figura 41: Sincronización de receptoras. Celos naturales.

B: Prostaglandinas

Se inyecta una $PGF_{2\alpha}$ (2 ml de Fertagyl[®] i.m.) y entre 2-4 días la receptora puede estar en celo (Figura 42).

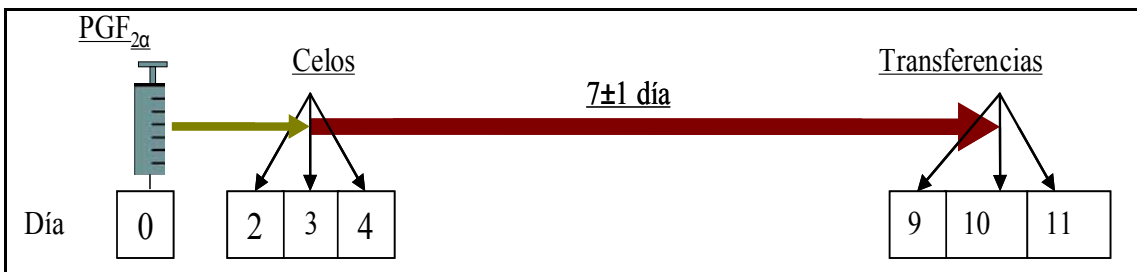


Figura 42: Sincronización de receptoras. Prostaglandinas.

Grupo 2: Tratamientos de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular emergente del celo, la ovulación y sin superovulación. Producen un solo CL; son el **C** =PRID[®] completo con la cápsula de estrógenos (Figura 43) y un tratamiento similar al PRID[®] completo pero sin estrógenos, durante 12 días y con GnRH a las 48 horas de retirada del dispositivo, con o sin aplicación hormonal el día de retirada del dispositivo de **P**₄, **D**= P₄-12+GnRH.

Dentro de este grupo los tratamientos **E**= P₄-12+GnRH + 500 U.I. eCG, y el **F**= P₄-12+GnRH + 75 U.I. Pluset[®], que son una variante del tratamiento **D**, solo tienen transferencias en el tratamiento postransferencia 2 para mejorar la fertilidad.

C: PRID[®] completo con cápsula de benzoato de estradiol

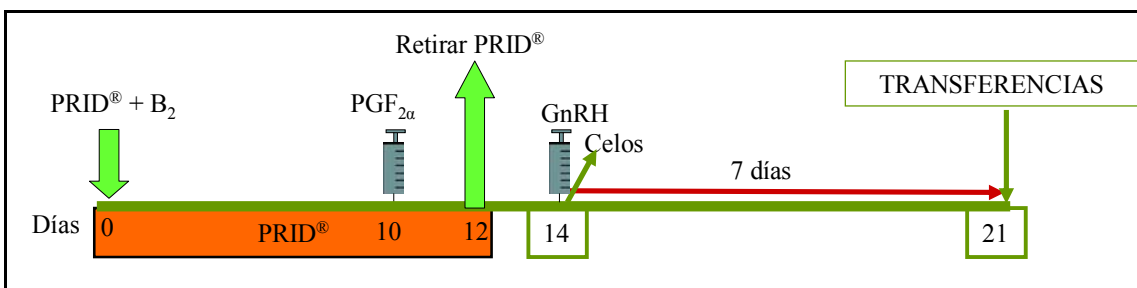


Figura 43: Sincronización de receptoras. PRID[®] completo con cápsula de benzoato de estradiol.



D: P₄-12+GnRH

Este tratamiento es una variante del anterior, con un dispositivo vaginal de P₄ (CIDR[®]), durante 12 días y con GnRH 48 horas después de la retirada del dispositivo de P₄; tiene como objetivo producir un folículo dominante grande, que dé lugar a un CL grande, con un diámetro de 2 cm o más, que garantice una producción alta de P₄, altos porcentajes de utilización de receptoras y de gestación.

En su aplicación práctica, se coloca un CIDR[®] el día 0, a los 10 días se inyecta una PGF_{2α} (2 ml de Estrumate[®] i.m.) y el día 12 se retira el CIDR[®]; dos días más tarde, las receptoras entran en celo y se inyecta GnRH (5 ml de Fertagyl[®] i.m.); siete días más tarde, día 21, se realizan las transferencias. Es un tratamiento prácticamente idéntico al PRID[®] completo, con la diferencia que ahora no lleva ningún tipo de estrógeno. Este tratamiento tiene 4 actuaciones farmacológicas sobre la receptora, exceptuando el día de la transferencia (Figura 44).

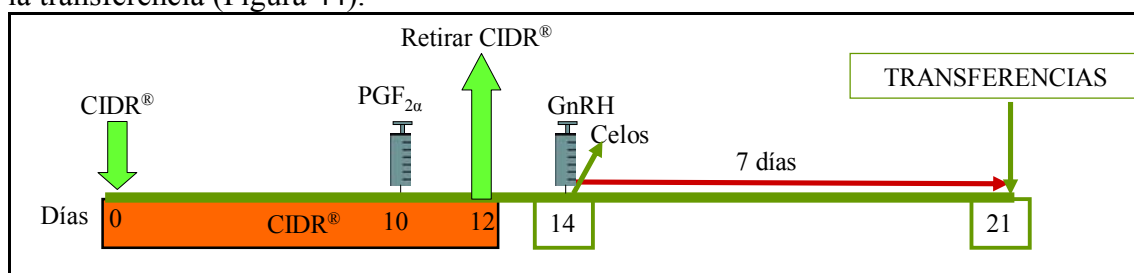


Figura 44: Sincronización de receptoras. P₄-12+GnRH.

E: P₄-12+GnRH + 500 U.I. de eCG

Es igual que el anterior, pero en el día 12, al retirar el CIDR[®], inyectamos 500 U.I. de eCG i.m. (Foligón[®]) para intentar que crezca un poco más el folículo dominante y obtener un CL mejor. Este tratamiento tiene 4 actuaciones farmacológicas sobre la receptora, exceptuando el día de la transferencia. Este tratamiento solo tiene transferencias en el tratamiento postransferencia 2 para mejorar la fertilidad (Figura 45).

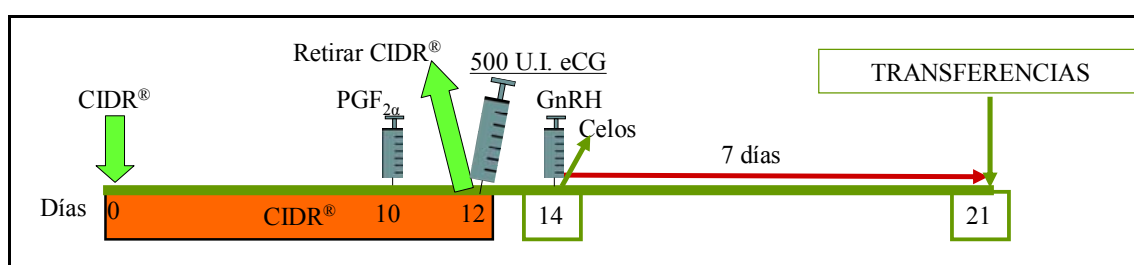


Figura 45: Sincronización de receptoras. P₄-12 +GnRH + 500 U.I. de eCG.

F: P₄-12+GnRH +75 U.I. de Pluset[®]

Es igual que el anterior pero en el día 12 al retirar el CIDR[®] inyectamos 75 U.I. de FSH (PLUSET[®]), para intentar que crezca un poco más el folículo dominante. Este tratamiento tiene 4 actuaciones farmacológicas sobre la receptora, exceptuando el día de la transferencia (Figura 46).

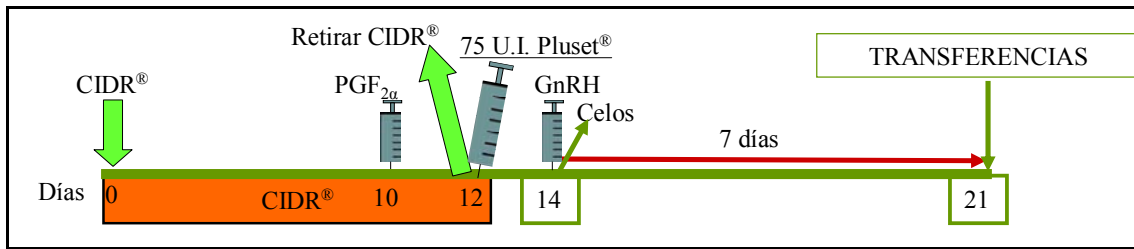


Figura 46: Sincronización de receptoras. P₄-12+GnRH +75 U.I. de Pluset[®].

Grupo 3: Tratamientos de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular emergente, del celo y la ovulación y con superovulación, (Fuentes and de la Fuente., 1997; Fuentes, 2000; Baruselli *et al.*, 2001; Looney *et al.*, 2010). Producen varios CL, es necesario más manejo con las receptoras y nos permiten realizar TETF sin necesidad de detección de celos; son el **G**= P₄E₂ 1000 U.I. eCG; **H**= P₄E₂ 750 U.I. eCG; **I**= P₄E₂ 325 U.I. Pluset[®].

Dentro de este grupo el tratamiento **J**= GNRH 750 UI eCG, solo tiene transferencias en el tratamiento postransferencia 2 para mejorar la fertilidad.

G: P₄E₂ +1.000 U.I. de eCG

El objetivo de este tratamiento es sincronizar la emergencia de la onda folicular e inducir una moderada superovulación (Foto 39) en las receptoras que facilite la selección de éstas y aumente lo niveles de P₄ en plasma que pueden aumentar la fertilidad (Fuentes and de la Fuente., 1997; Fuentes 2000; Binelli *et al.*, 2001; Baruselli *et al.*, 2001; Tríbulo *et al.*, 2002; Looney *et al.*, 2010).

El día cero por la mañana, se coloca un PRID[®] (sin la cápsula hormonal) y se inyecta. 5 mg de E₂ i.m. (Estilbo Vitaminado[®]), más 100 mg de P₄ i.m. (Progesterona E[®]), ya que al inyectar P₄ junto con E₂, se produce una mejor sincronización de la onda folicular (Bo *et al.*, 1995b); el día 4 a.m., se inyectan 1.000 U.I. de eCG i.m. (Foligón[®]), dos días más tarde, día 6, se inyecta una PGF_{2α} (2 ml de Estrumate[®] i.m.) por la mañana, y por la tarde, se retira el PRID[®], dos días después, día 8, las receptoras están en celo y se inyecta GnRH (5 ml de Fertagyl[®] i.m.) por la tarde. Este tratamiento tiene 5 actuaciones farmacológicas sobre la receptora, exceptuando el día de la transferencia (Figura 47).

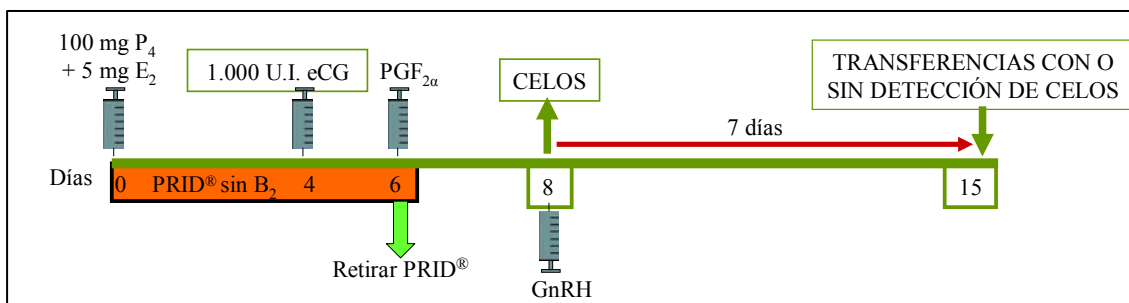


Figura 47: Sincronización de receptoras. PRID[®] + P₄ + E₂ +1000 U.I. de eCG.

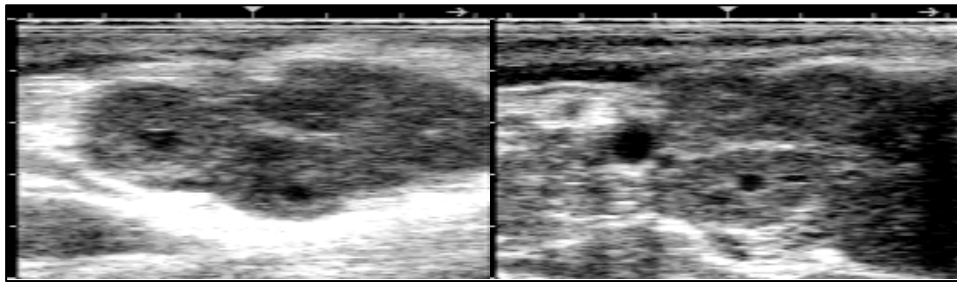


Foto 39: Ecografía de ovarios de receptora superovulados. Día 7.

H: P₄E₂ + 750 U.I. de eCG

Este tratamiento es igual que el anterior con la diferencia de que en lugar de 1.000 U.I. de eCG se inyectan 750 U.I. de eCG i.m. (Foligón®) (Figura 48).

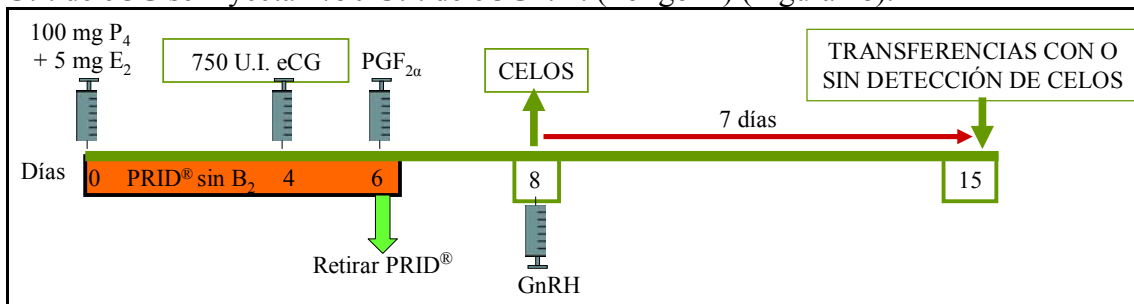


Figura 48: Sincronización de receptoras. PRID® + P₄ + E₂ + 750 U.I. de eCG (Foligón®).

I: P₄E₂ +Pluset® en dosis partida

Este tratamiento es igual que los dos anteriores pero cambiamos de hormona, aquí usamos Pluset® en lugar de eCG con el objetivo de ver si con la FSH/LH (Pluset®), aplicada en dosis partida igual que lo hacemos en la superovulación de vacuno de carne, podríamos obtener mejores porcentajes de gestación (Bó *et al.*, 1994; Fuentes and de la Fuente., 2010a; Fuentes and de la Fuente, 2010b; Fuentes *et al.*, 2012).

El día cero por la mañana, se coloca un PRID® sin la cápsula hormonal y se administran 5 mg de E₂ i.m., (Estilbo Vitaminado®) más 100 mg i.m. de P₄ (Progesterona E®); el día 4 am se inyectan 100 U.I. de Pluset® i.m. y 150 U.I. de Pluset® s.c., detrás de la escápula entre ésta y las costillas; dos días más tarde, día 6, se inyecta 2 ml de Estrumate® i.m. por la mañana y 75 U.I. de Pluset® s.c., detrás de la escápula; por la tarde se retira el PRID® dos días más tarde, día 8 las receptoras están en celo y se inyecta GnRH i.m. (5 ml de Fertagyl®) por la tarde. Este tratamiento tiene 5 actuaciones farmacológicas sobre la receptora, exceptuando el día de la transferencia (Figura 49).

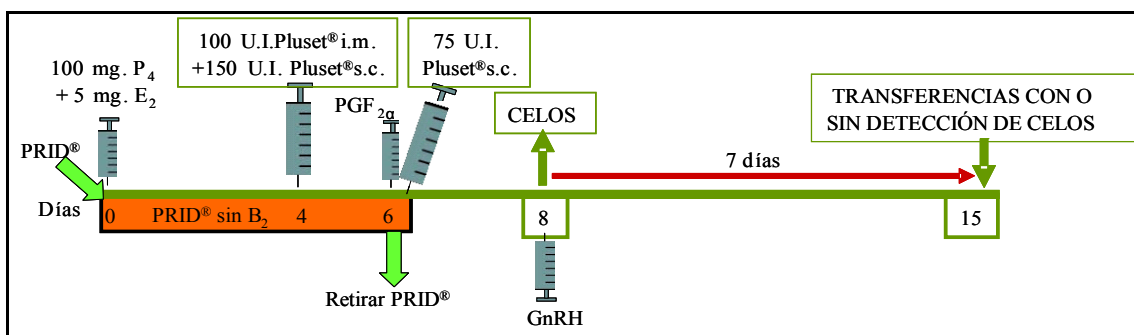


Figura 49: Sincronización de receptoras. PRID® + P₄ + E₂ +Pluset® en dosis partida.



J: P₄GnRH + 750 U.I. de eCG

Con la prohibición de los estrógenos y sus derivados y las progesteronas inyectables, utilizamos GnRH para sincronizar la onda folicular.

El día cero por la mañana, se coloca un CIDR[®]; el día 2 por la tarde (60 horas después), se inyectan 5 ml i.m. de Fertagyl[®] y el día 4 a.m., se inyectan 750 U.I. i.m. de eCG (Foligón[®]). Dos días más tarde, día 6, se inyecta 2 ml i.m. de Estrumate[®] por la mañana, y por la tarde se retira el CIDR[®], dos días después, día 8, las receptoras están en celo y se inyecta 5 ml i.m. de Fertagyl[®] por la tarde. Este tratamiento tiene 6 actuaciones farmacológicas sobre la receptora, exceptuando el día de la transferencia (Figura 50).

Este tratamiento solo tiene transferencias en el tratamiento postransferencia 2 para mejorar la fertilidad.

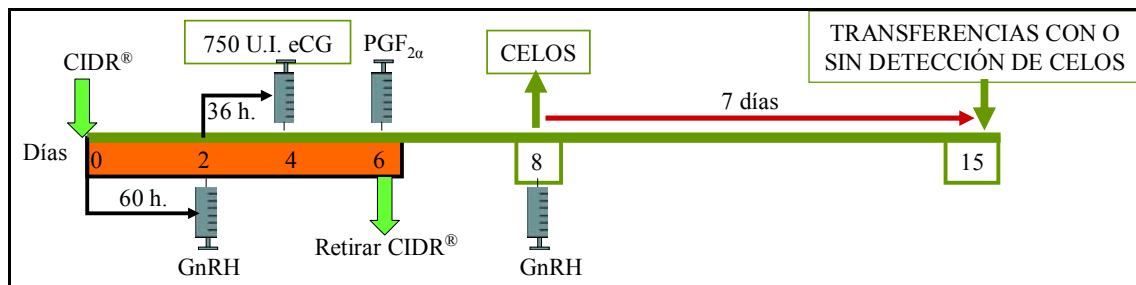


Figura 50: Sincronización de receptoras. CIDR[®] + GnRH + 750 U.I. de eCG.

III.2.13- Determinación de la calidad del cuerpo lúteo

La determinación de la calidad del CL de la receptora, es un aspecto crítico, ya que nos indica la idoneidad de la hembra para serle transferido un embrión; tenemos que determinar en que ovario se encuentra el CL y la calidad de éste

Los datos de la calidad del CL se han determinado en este estudio, por exploración rectal, método subjetivo en el que la experiencia del técnico, es un factor determinante (Beal, 1999). En nuestro trabajo, hemos utilizado los criterios establecidos por (Nieman *et al.*, 1985) que clasifica los CL en tres categorías: excelentes, regulares y malos, en función de la forma, tamaño, consistencia, presencia de corona y con separación clara entre el ovario y el CL.

En el año 2009 empezamos a ecografiar; el uso del ecógrafo se ha impuesto ya que nos proporciona datos objetivos sobre la calidad del CL, nos da la oportunidad de ver una sección del CL, podemos medir el diámetro y calcular el área, ver si existe cavidad, su tamaño, el grosor de la pared y si es homogénea, (Fotos 36, 38, 39, 40, 41 y 42), sin embargo, no hemos incluido los datos de las receptoras ecografiadas en el presente estudio, ya que solo se han transferido embriones a receptoras con CL con un diámetro ≥ 15 mm y si existe cavidad, ésta tiene que ser menor de 10 mm, con un espesor de pared mayor de 3 mm, y ser uniforme, es decir, en receptoras con CL (excelentes o regulares); además, las hembras que han sido ecografiadas, independientemente del tratamiento de sincronización realizado, recibieron todas el tratamiento postransferencia 2 para mejorar la fertilidad (Figura 57), lo que puede modificar los resultados frente a una situación sin tratamiento postransferencia y por lo tanto, introducen factores de



confusión que hacen imposible cualquier comparación en las variables estudiadas. Por esta razón, no se han incluido estos datos en el presente trabajo experimental.

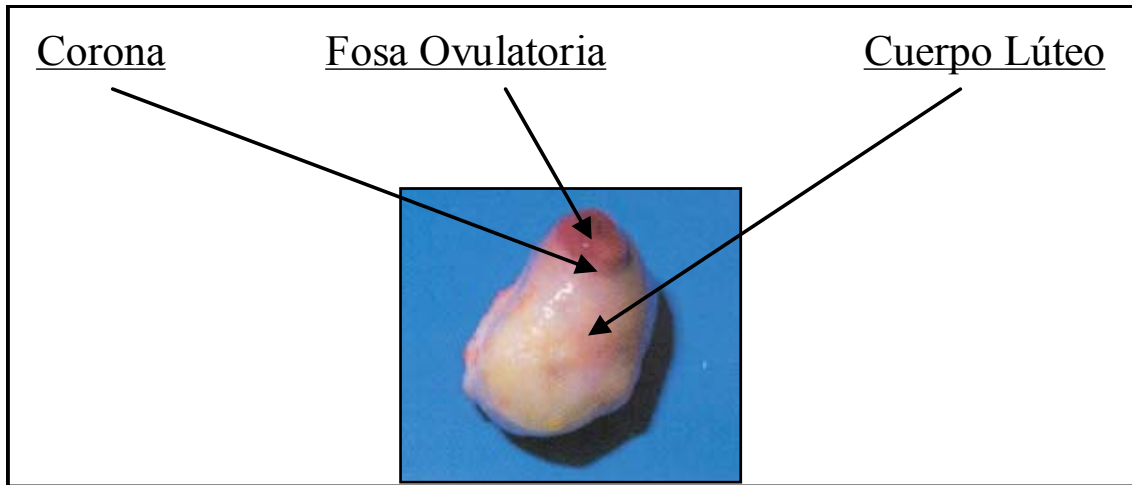


Foto 40: Ovario con CL, día 6 del ciclo.

Las ecografías se han realizado con un ecógrafo portátil Easi Scan[®] (BCF Technology Ltd.), (Foto 37), con pantalla integrada en unas gafas y un transductor fijo de 128 elementos de banda ancha y una frecuencia de 4,5 MHz a 8,5 MHz.



Foto 41: Ecógrafo Easi Scan[®] (BCF Technology Ltd.)

Cuando realizamos ecografías, el criterio que utilizamos es que el diámetro del CL tiene que ser igual o superior a 15 mm; si existe cavidad esta tiene que ser menor de 10 mm, con un espesor de pared mayor de 3 mm, y ser uniforme

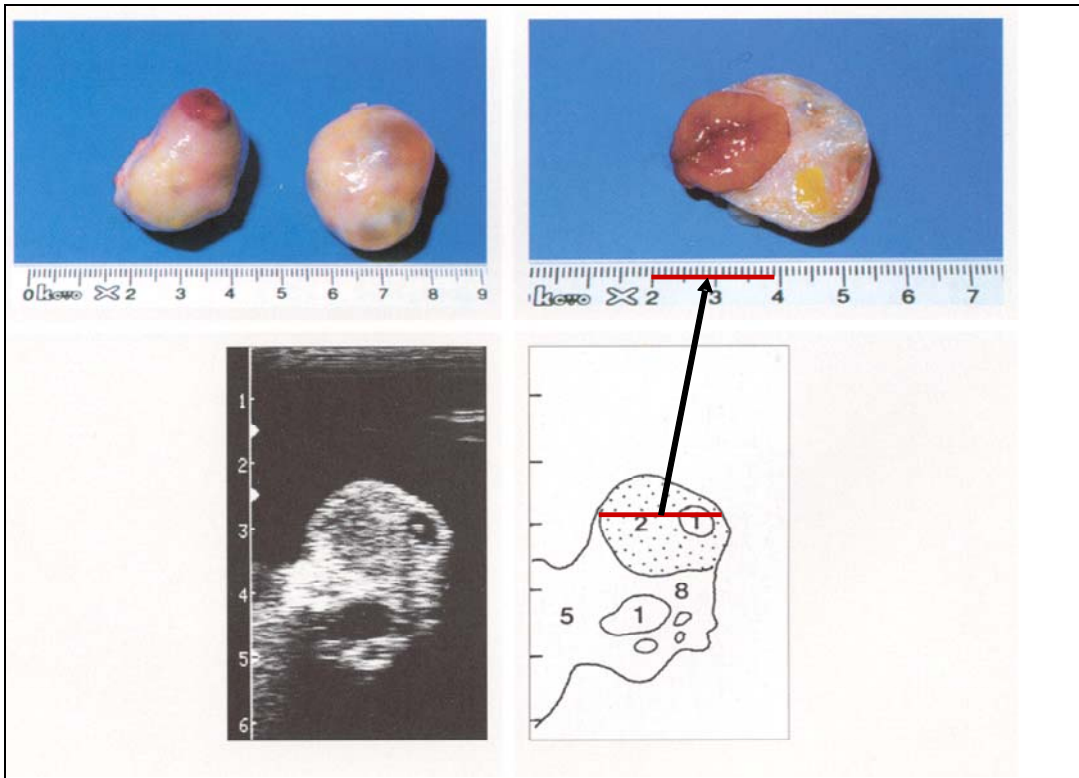


Foto 42: Ovarios día 6 del ciclo, con una sección del CL.

Este ovario (Foto 42), por palpación puede ser un CL algo difícil de valorar, tiene mucho tejido luteal dentro del ovario y no se nota una separación clara entre el CL y el ovario, aunque se puede palpar bien la fosa ovulatoria; podríamos pensar en un CL pequeño y descartar la receptora; sin embargo tiene 1,9 cm de diámetro y es un buen CL.

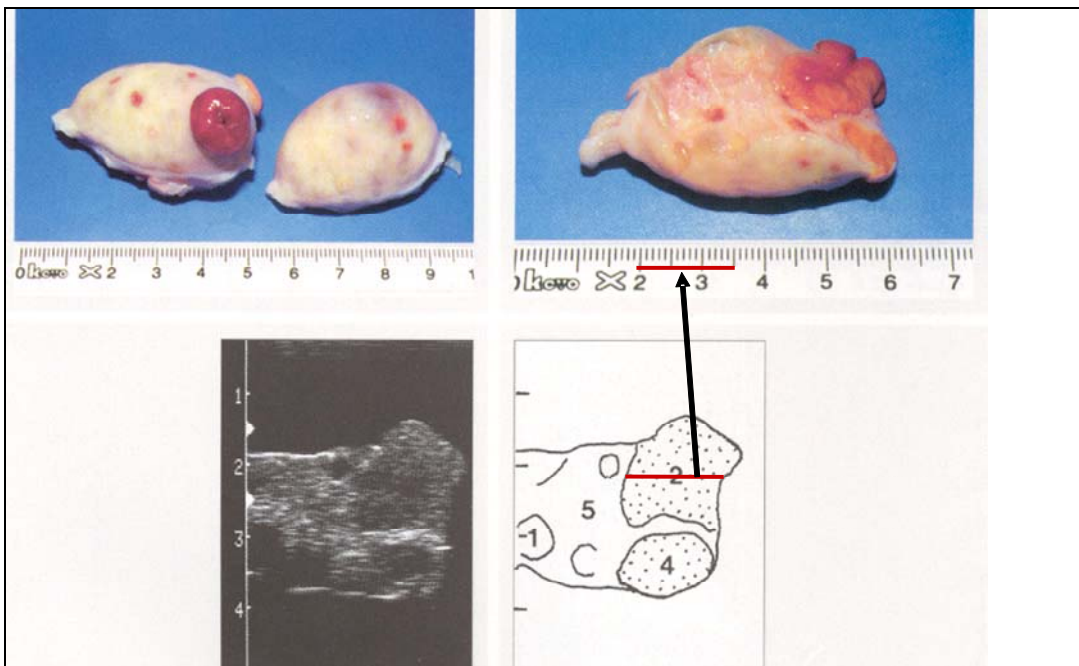


Foto 43: Ovarios día 6 del ciclo con una sección del CL.



Este ovario (Foto43), por palpación el CL sobresale más que el anterior pero no está tan dentro del ovario; es más fácil de valorarlo; pero tiene 1,5 cm de diámetro; esta al límite de aceptación según nuestro criterio.

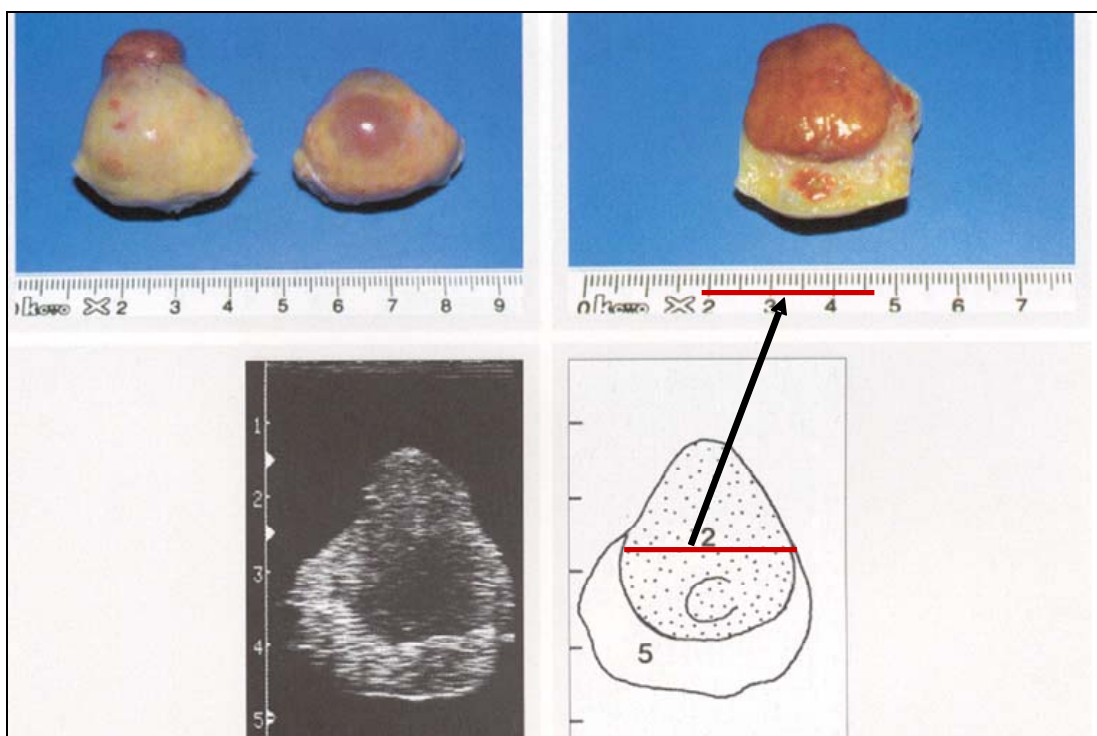


Foto 44: Ovario día 7 del ciclo con una sección del CL.

Este ovario (Foto 44), a la palpación es un CL de buen tamaño, en el que se nota bien la corona y la fosa ovulatoria así como la separación clara entre el CL y el ovario; tiene mucho CL interno y un diámetro de 2,7cm, es un CL excelente.

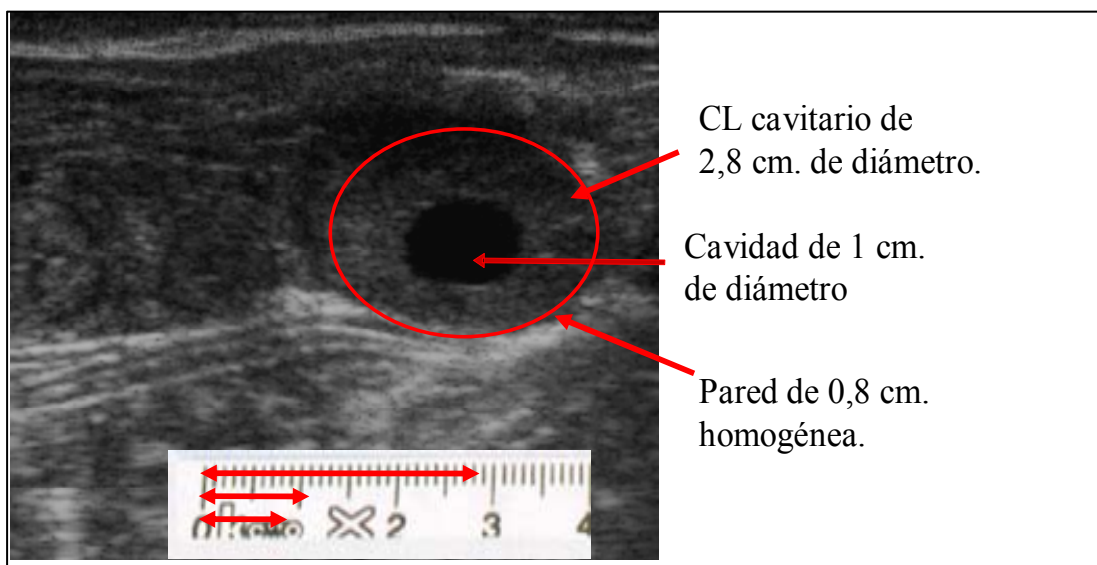


Foto 45: Ecografía de CL de buena calidad. Ovario día 7 del ciclo.

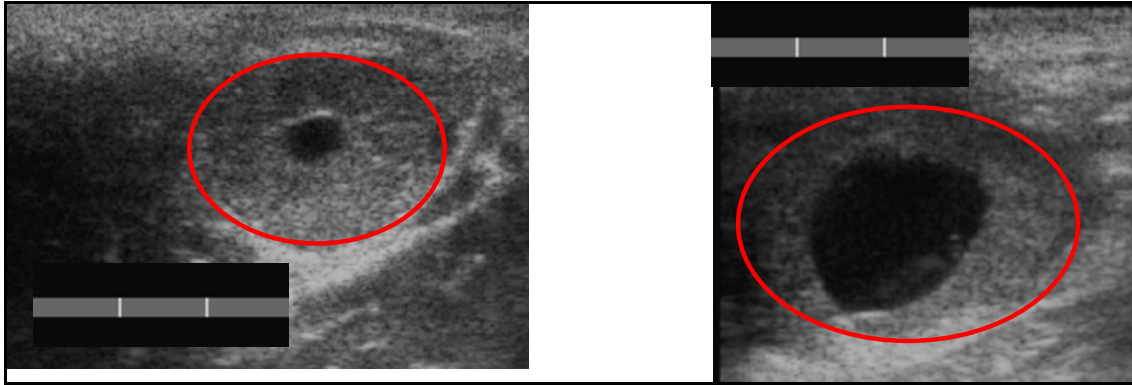


Foto 46: Ecografía de CL día 7 del ciclo
CL de 3 cm de diámetro. Excelente.

Ecografía de CL día 7 de casi 4 cm de diámetro con una gran cavidad de 2 cm, y pared no homogénea. Malo

III.2.14.- Tratamientos utilizados postransferencia, para mejorar la fertilidad

Se han utilizado un total de 2.648 receptoras repartidas entre tres grupos de tratamientos postransferencia de los embriones. En el tratamiento postransferencia 1, se han utilizado 844 receptoras; en el tratamiento postransferencia 2, se han utilizado 1.568 receptoras y en el tratamiento postransferencia 3, se han utilizado 236 receptoras.

1.- Tratamiento postransferencia 1 DP₄-7

Consiste en la inserción de un dispositivo vaginal de P₄ (PRID[®] sin cápsula hormonal o PRID Alfa[®]), el día 7 después del celo de la receptora, e inmediatamente después de la transferencia del embrión; el dispositivo se retira 12 días después de la colocación (Figura 51). Se han utilizado 844 receptoras repartidas en los tratamientos de sincronización del grupo 1 (A y B) (n=303) y los tratamientos de sincronización del grupo 3 (D, E y F). (n=541). El objetivo de este tratamiento es aumentar los niveles de P₄ en sangre.

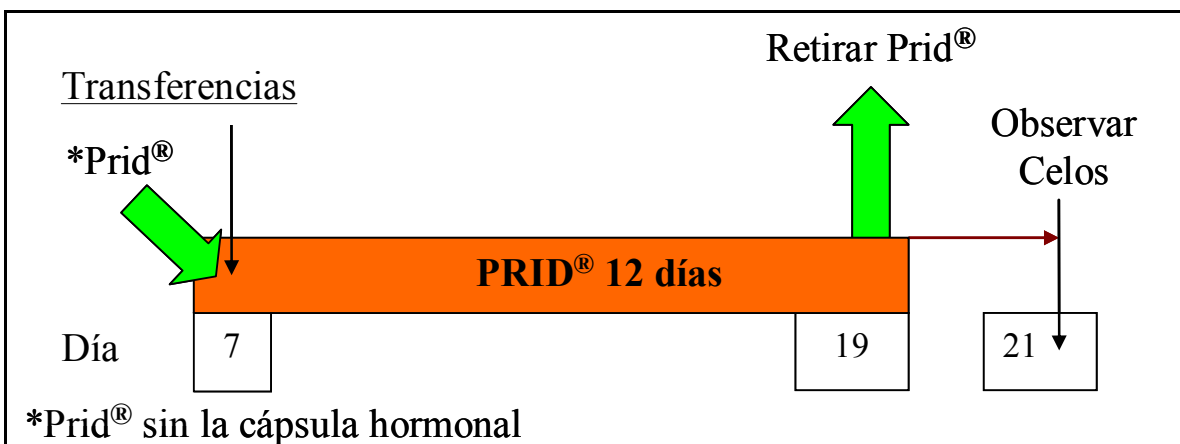


Figura 51: Tratamiento postransferencia 1. DP₄-7.

2.- Tratamiento postransferencia 2. DP₄-7 + GnRH

Consiste en la inserción de un dispositivo vaginal de P₄, (PRID[®] sin cápsula hormonal, o PRID Alfa[®]) el día 7 después del celo de la receptora, e inmediatamente después de la transferencia del embrión; el dispositivo se retira 12 días después de la



colocación. Se aplican dos GnRH (5 ml de Fertagyl® i.m.), una, el día de la transferencia (día 7) y otra, diez días después (Figura 52).

El objetivo de este tratamiento postransferencia 2 es aumentar los niveles de P4 endógena en sangre, producida por los cuerpos lúteos accesorios que se hayan podido formar tras la aplicación de las dos GnRH. La segunda GnRH aplicada el día 17, provoca la ovulación del folículo dominante que se ha formado con la onda folicular originada después de la primera GnRH, esto dará lugar a un nuevo CL pero sobretodo disminuye la concentración de E₂, inhibiendo o retrasando la luteolisis, ya que concentraciones altas de E₂ pueden estimular la secreción de PGF_{2α} en el período crítico del reconocimiento maternal de la gestación (Binelli *et al.*, 2001).

En este tratamiento postransferencia 2 se han utilizado 1.568 receptoras, repartidas en los tratamientos de sincronización de grupo 1 (A y B) (n = 304), los tratamientos de sincronización del grupo 2 (C, D, E y F) (n = 430) y los tratamientos del grupo 3 (G, H, I y J) (n = (834).

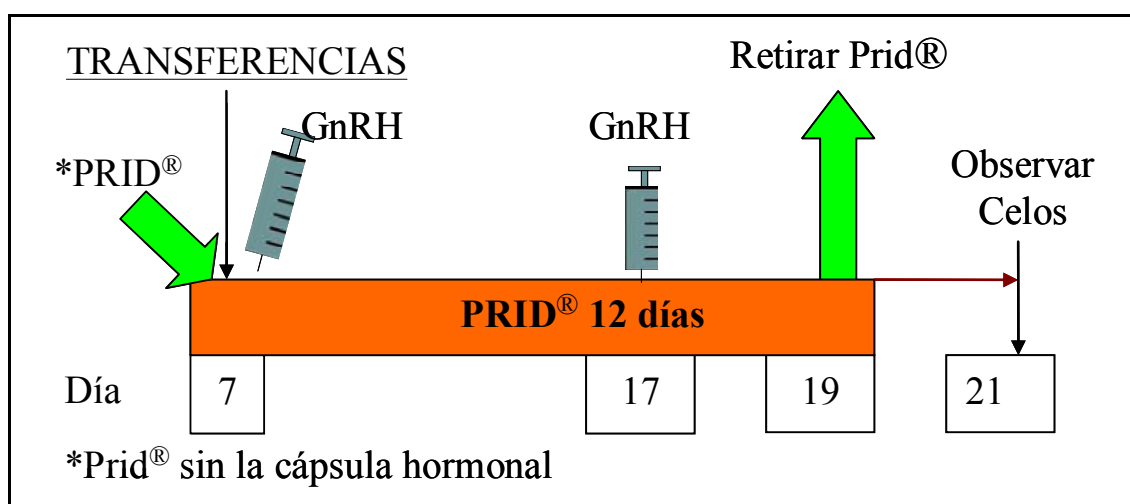


Figura 52: Tratamiento postransferencia 2. DP₄₋₇ + GnRH.

3.- Tratamiento postransferencia 3. FM7

Consiste en la aplicación de 500 mg (i.m) de flunixin meglumine (Finadyne®) inmediatamente antes de la transferencia. Se han utilizado 236 receptoras repartidas en los tratamientos de sincronización del grupo 1 (B) (n = 79) y del grupo 3 (G) (n = 157) (Figura 3).

El objetivo es evitar la producción de prostaglandinas por el endometrio, debido a la manipulación que se produce durante la transferencia del embrión.

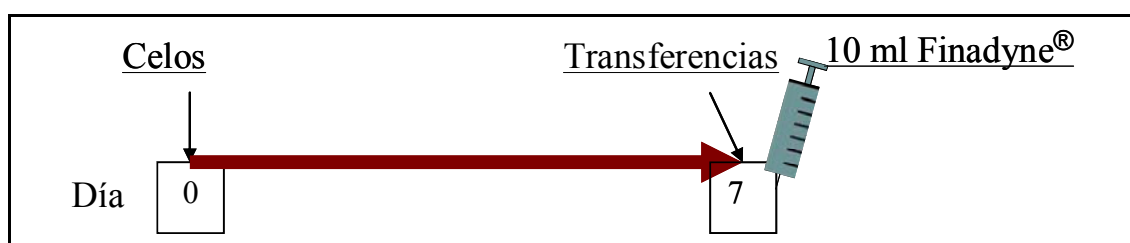


Figura 53: Tratamiento postransferencia 3. FM7.



III.3.- Diseño experimental

Este trabajo de investigación esta compuesto por 2 experimentos:

- **Experimento 1.-** En el que se han analizado diferentes tratamientos de sincronización de receptoras y el efecto de diferentes factores como el tipo de embrión, el estado de desarrollo y la calidad del CL por exploración manual.
- **Experimento 2.-** En el que se han analizado diferentes tratamientos postransferencia, utilizados para mejorar la fertilidad.

Se han utilizado un total de 4.898 receptoras repartidas entre los diferentes protocolos de sincronización de receptoras (experimento 1, n= 2.250) y los tres tratamientos postransferencia de los embriones a las receptoras (experimento 2, n = 2.648). Dentro de cada tratamiento, hay transferencias de embriones en FRE, congelados en GLI y congelados en ETG para TD.

A continuación se describen cada uno de ellos con más detalle:

- **Experimento 1:** El objetivo de este experimento es comparar los porcentajes de gestación en función del tipo de tratamiento de sincronización, del tipo de embrión, del estado de desarrollo y de la calidad del CL por exploración manual. Los tratamientos de sincronización de receptoras se han agrupado en tres grupos, en función del control farmacológico de la onda folicular y de la superovulación de las receptoras. En las tablas 12,13 y 14 se puede ver la distribución de datos en cada grupo y el tratamiento de sincronización, en función del tipo de embrión, estado de desarrollo y calidad del CL.

Tabla 12: Experimento 1: Distribución de datos en función del grupo y tipo de tratamientos de sincronización de receptoras y del tipo de embrión.

Grupo de tratamientos de sincronización de receptoras	Tratamiento	Total Recep. n	Tipo de embrión		
			FRE n	GLI n	ETG n
GRUPO 1: Tratamientos sin control de la onda folicular y sin superovulación.	A = Celos naturales.	505	40	392	73
	B = Prostaglandinas.	697	94	482	121
	Totales	1.202	134	874	194
GRUPO 2: Tratamientos con control de la onda folicular, del celo, la ovulación y sin superovulación.	C = PRID [®] completo (con B ₂).	102	15	87	-
	D = P ₄ -12+GnRH.	50	50	-	-
	Totales	152	65	87	-
GRUPO 3: Tratamientos con control de la onda folicular, del celo, la ovulación y con superovulación.	G = P ₄ E ₂ 1.000 U.I. eCG.	449	149	72	228
	H = P ₄ E ₂ 750 U.I. eCG.	178	59	-	119
	I = P ₄ E ₂ 325 U.I FSH/LH (Pluset [®])	269	107	63	99
	Totales	896	315	135	446
TRATAMIENTOS TOTALES		2.250	514	1.096	640



Tabla 13: Experimento 1: Distribución de datos en función del grupo, tipo de tratamientos de sincronización de receptoras y del estado de desarrollo del embrión.

Grupo de tratamientos de sincronización de receptoras	Tratamiento	Total Recep. n	Estado de desarrollo			
			4 n	5 n	6 n	7 n
GRUPO 1: Tratamientos sin control de la onda folicular y sin superovulación	A = Celos naturales.	505	256	142	62	45
	B = Prostaglandinas.	697	324	201	102	70
	Totales	1.202	580	343	164	115
GRUPO 2: Tratamientos con control de la onda folicular, del celo, la ovulación y sin superovulación.	C = PRID [®] completo (con B ₂).	102	44	28	19	11
	D = P ₄ -12+GnRH.	50	34	8	5	3
	Totales	152	78	36	24	14
GRUPO 3: Tratamientos con control de la onda folicular, del celo, la ovulación y con superovulación.	G = P ₄ E ₂ 1.000 U.I. eCG.	449	245	122	64	18
	H = P ₄ E ₂ 750 U.I. eCG	178	90	62	23	3
	I = P ₄ E ₂ 325 U.I. FSH/LH (Pluset [®])	269	153	71	37	8
	Totales	896	488	255	124	29
TRATAMIENTOS TOTALES		2.250	1.146	634	312	158

Tabla 14: Experimento 1: Distribución de datos en función del grupo, tipo de tratamientos de sincronización de receptoras y de la calidad del cuerpo lúteo por exploración manual (ha sido excluido el grupo 3 de hembras superovuladas y aquellas hembras del grupo 2 que han sido ecografiadas).

Grupo de tratamientos de sincronización de receptoras	Tratamiento	Total Recep. n	Calidad del CL		
			1 n	2 n	3 n
GRUPO 1: Tratamientos sin control de la onda folicular y sin superovulación	A = Celos naturales.	505	129	259	117
	B = Prostaglandinas.	697	159	359	179
	Totales	1.202	288	618	296
GRUPO 2: Tratamientos con control de la onda folicular, del celo, la ovulación y sin superovulación.	C = PRID [®] completo (con B ₂).	102	34	51	17
	D = P ₄ -12+GnRH.	2	1	1	-
	Totales	104	35	52	17
TRATAMIENTOS TOTALES		1306	323	670	313



- **Experimento 2:** A través de este experimento se quiere comparar, la eficacia de diferentes tratamientos postransferencia utilizados para mejorar la fertilidad. La tabla 15 describe los tratamientos utilizados y la distribución de datos en cada tipo de tratamiento.

Tabla 15: Experimento 2. Distribución de datos en función de grupo, tipo de tratamientos utilizados y del tratamiento postransferencia

Grupo de tratamientos de sincronización de receptoras	Tratamiento	Tratamientos postransferencia		
		1 (DP ₄₋₇)	2 (DP ₄₋₇ +GnRH)	3 (FM7)
GRUPO 1: Tratamientos sin control de la onda folicular y sin superovulación	A = Celos Naturales.	112	93	-
	B =Prostaglandinas.	191	211	79
	Totales	303	304	79
GRUPO 2: Tratamientos con control de la onda folicular, del celo, la ovulación y sin superovulación.	C = PRID [®] completo (con B ₂).	-	87	-
	D = P ₄ -12+GnRH.	-	250	-
	E = P ₄ -12+GnRH +500UI eCG	-	45	-
	F = P ₄ -12+GnRH+75UI FSH/LH (Pluset [®])	-	48	-
	Totales	-	430	-
GRUPO 3: Tratamientos con control de la onda folicular, del celo, la ovulación y con superovulación.	G = P ₄ E ₂ 1.000 U.I. eCG.	299	391	157
	H = P ₄ E ₂ 750 U.I. eCG	88	156	-
	I = P ₄ E ₂ 325 U.I. FSH/LH (Pluset [®]).	154	204	-
	J = P ₄ GnRH 750 UI eCG	-	83	-
	Totales	541	834	157
Total tratamientos		844	1.568	236

III.4.- Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se han realizado utilizando el paquete estadístico SAS 9.3 Copyright (c) 2002-2010 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) aplicándose la prueba χ^2 para analizar si las diferencias observadas en la distribución de frecuencias eran o no significativas.

Para analizar el efecto de cada una de las variables analizadas (tipo de tratamiento, tipo de embrión, estado de desarrollo y calidad del cuerpo lúteo) y de los diferentes niveles observados dentro de las mismas se utilizó el procedimiento GLM del mismo paquete estadístico SAS. Dicho procedimiento realiza un análisis de varianza de efectos fijos y permite obtener las estimas de mínimos cuadrados de los diferentes niveles dentro de cada efecto.

De forma general, se tomó como variable dependiente el éxito en la gestación (0: no gestante y 1: gestante) y como variables independientes cada una de las variables



analizadas: grupo de tratamiento, tipo de tratamiento, tipo de embrión, estado de desarrollo y calidad del CL.

Concretamente el modelo aplicado para el experimento 1 fue el siguiente:

$$\text{FERTI}_{ijklm} = \text{GRUPO}_i + \text{TIPO}_j + \text{ED}_k + \text{CCL}_l + e_{ijklm}$$

Donde:

- FERTI representa el resultado de la gestación (0, no gestante; 1: gestante).
- GRUPO representa el grupo de tratamiento con tres niveles (1: sin superovulación y sin control farmacológico de la onda folicular; 2: sin superovulación y con control farmacológico de la onda folicular; 3: con superovulación y con control farmacológico de la onda folicular).
- TIPO representa el tipo de embrión con tres niveles (FRE, GLI, ETG).
- CCL representa la calidad del cuerpo lúteo con tres niveles (1, 2 y 3).
- ED representa el estado de desarrollo del embrión con 4 niveles (4, 5, 6 y 7).
- e_{ijklm} representa el error asociado a cada observación.

En este modelo no se pudo incluir el efecto del tipo de tratamiento dado que los tipos de tratamiento aplicados fueron diferentes dentro de cada grupo y se daba una confusión de efectos entre grupo y tipo de tratamiento. Por ello, para poder obtener información sobre el efecto del tipo de tratamiento se realizó el mismo análisis de forma independiente dentro de cada grupo utilizando el siguiente modelo:

$$\text{FERTI}_{ijklm} = \text{TRATAMIENTO}_i + \text{TIPO}_j + \text{ED}_k + \text{CCL}_l + e_{ijklm}$$

Donde:

- TRATAMIENTO_i representa el tratamiento aplicado en cada grupo con dos niveles para el grupo 1 (A, B); dos niveles para el grupo 2 (C, D) y tres niveles para el grupo 3 (G, H, I). Para determinados efectos este análisis también se realizó dentro de cada grupo.

En el experimento 2, para analizar el efecto del tipo de tratamiento postransferencia se aplicó el siguiente modelo a cada tipo de tratamiento postransferencia:

$$\text{FERTI}_{ijklm} = \text{GRUPOEXP}_i + \text{TIPO}_j + \text{ED}_k + \text{CCL}_l + e_{ijklm}$$

Donde

- GRUPOEXP representaba el efecto del tratamiento con dos niveles (1: grupo sin tratamiento postransferencia; 2: grupo con tratamientos postransferencia). En este análisis también existía una confusión entre grupo y tipo de tratamiento de sincronización.
- TIPO representa el tipo de embrión con tres niveles (FRE, GLI, ETG).
- CCL representa la calidad del cuerpo lúteo con tres niveles (1, 2 y 3).
- ED representa el estado de desarrollo del embrión con 4 niveles (4, 5, 6 y 7).
- e_{ijklm} representa el error asociado a cada observación.

Por lo que análogamente al experimento 1 el análisis se hizo tanto para todo el conjunto de animales tratados y no tratados como para cada grupo de tratamiento.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN



IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han transferido 4.898 embriones, todos calidad 1 (excelentes), previa a la congelación o transferencia en fresco; el porcentaje de gestación global ha sido del 59,19%. En fresco, se han transferido 1.176 embriones (24,01%), con un porcentaje de gestación del 63,69%; congelados en glicerol, 1.666, de los cuales 42 (2,52%), resultaron muertos en la valoración posdescongelación, transfiriéndose 1.624 (33,16%), con un porcentaje de gestación del 59,85% y finalmente, se congelaron en etilenglicol 2.098 embriones (42,83%), que se descongelaron para su TD con un porcentaje de gestación del 56,15%, (Tabla 16).

Tabla 16: Total de transferencias realizadas en este estudio experimental y porcentajes de gestación alcanzados, teniendo en cuenta el tipo de embrión.

Tipo de embrión	Transferencias n	% sobre el total	Gestaciones n	% de gestación
Fresco	1.176	24,01	749	63,69
Glicerol	1.624	33,16	972	59,85
Etilenglicol	2.098	42,83	1.178	56,15
TOTALES	4.898	100	2.899	59,19

Todas las receptoras utilizadas en este estudio han sido novillas Frisonas entre 14 y 17 meses de edad, sin ninguna patología aparente; todas fueron examinadas previamente al inicio del tratamiento de sincronización, para determinar el estatus de su aparato reproductivo y la ausencia de patologías.

De las 2.899 gestaciones obtenidas, 27 receptoras (0,93%) murieron por diversas causas durante la gestación; 29 fueron vendidas a ganaderos cuyas explotaciones estaban fuera del control lechero (1%), y 404 sufrieron abortos (13,94%). Descontadas las receptoras muertas, las ventas y las muertes embrionarias o abortos, se han obtenido 2.439 partos, entre los que se encuentran 9 partos gemelares, por lo que el total de animales nacidos es de 2.448. Los machos nacidos son 1.289 (52,65%), de los cuales han nacido vivos 1.124 (87,20%) y 165 muertos (12,8%); con respecto a las hembras, han nacido 1.159 (47,34%), de las cuales 1.020 (88%), nacieron vivas y 139 muertas (11,99%). Descontando las receptoras vendidas del total de embriones transferidos, de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, se necesitan de media 2,27 embriones transferidos, para obtener un descendiente vivo (macho o hembra), 4,77 embriones para obtener una hembra viva, y 4,33 embriones de media, para obtener un descendiente macho vivo.

IV.1.- EXPERIMENTO 1: Tratamientos de sincronización de receptoras, tipo de embrión, estado de desarrollo del embrión y calidad del cuerpo lúteo.

IV.1.1.- Tratamientos de sincronización de receptoras

Los diferentes tratamientos de sincronización de receptoras se han dividido en tres grupos en función de la posibilidad o no del control de la onda folicular y la superovulación de las receptoras, grupos de tratamientos de sincronización 1, 2 y 3,



descritos en el apartado de Material y Métodos, (capítulo III.2.11, tratamientos de sincronización de receptoras), en los que se han transferido 2.250 embriones con un porcentaje de gestación global del 58,09% (Tabla 17).

Tabla 17: Porcentaje de gestación global obtenido en las 2.250 hembras receptoras en el experimento 1.

	Transferencias n	Gestaciones n	% Ges.
TRATAMIENTOS DE SINCRONIZACIÓN GRUPOS 1, 2 y 3	2.250	1.307	58,09

En el **grupo 1** de nuestro estudio, para el tratamiento A (celos naturales), se han realizado 505 transferencias con un porcentaje de gestación del 58,02% y para el tratamiento B (prostaglandinas), se han realizado 697 transferencias con un 60,4% de gestaciones. En total, se han transferido 1.202 embriones, resultando un porcentaje de gestación del 59,40%, (Tabla 18).

Tabla 18: Grupo 1. Tratamientos de sincronización de receptoras sin control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación.

Tratamientos de sincronización GRUPO 1	Transferencias n	Gestaciones n	% Ges
A = Celos naturales	505	293	58,02
B = Prostaglandinas	697	421	60,40
TOTALES GRUPO 1	1.202	714	59,40

Prueba χ^2 de contingencia no hay diferencias significativas en los porcentajes de gestación.

El análisis realizado muestra que no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) en los porcentajes de gestación totales, entre el tratamiento de sincronización con $\text{PGF}_{2\alpha}$ y los celos naturales, (60,40% vs. 58,02%, respectivamente).

Las prostaglandinas han sido un tratamiento muy usado en la sincronización de receptoras, pero se ha demostrado que provoca una gran variabilidad en la respuesta, ya que no es efectiva hasta el día 5 ó 6 siguiente al estro (Macmillan *et al.*, 1994) y la aparición del celo y la ovulación, dependen del estado de desarrollo en el que se encuentre el folículo dominante en el momento del tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$, lo que genera a su vez, una gran dispersión en la aparición de celos (que pueden ocurrir entre los 2 a 7 días postratamiento) (Kastelic and Ginther, 1991); esto, sumado a la ineficacia en la detección de celos, provoca que el porcentaje de aprovechamiento de receptoras sea menor cuando utilizamos tratamientos de sincronización con $\text{PGF}_{2\alpha}$ respecto a otros tratamientos utilizados en la TETF (Baruselli *et al.*, 2000b; 2000c e 2001; Tríbulo *et al.*, 2000; Bó *et al.*, 2002; Bó *et al.*, 2004b).

Y en este sentido, Fuentes (2000), comprueba que cuando se usan prostaglandinas como método de sincronización de receptoras, entre las hembras que no han mostrado celo y las rechazadas, se requiere una importante inversión en tiempo, (sobre todo en grupos grandes de receptoras), lo que en la práctica se traduce en que difícilmente conseguimos superar el 30% de aprovechamiento de receptoras y la cifra se hace aún menor (12,90%) (Bó *et al.*, 2004a), cuando hablamos de sincronizar hembras receptoras que se mantienen en el pasto en Sudamérica.



Todo ello lo vienen a corroborar Rodrigues *et al.* (2010), al señalar en su estudio que los protocolos de sincronización de receptoras que controlan la onda folicular y la ovulación, incrementan la proporción de vacas que reciben un embrión, frente a aquellas que reciben una PGF_{2α} después de observado su celo y se les transfiere un embrión (75%, vs. 34% respectivamente), alcanzando diferencias altamente significativas (P<0,0001).

Por todo lo anteriormente expuesto, y a pesar de los buenos resultados de gestación obtenidos en las hembras receptoras del grupo 1 en nuestro trabajo experimental (porcentaje global de gestación del 59,40%), incluso superiores a la mayoría de autores consultados cuando hablamos del uso de prostaglandinas como método de sincronización de celo en hembras receptoras de embriones (60,40%) (Bó *et al.*, 2002; Bó *et al.*, 2004a; Baruselli *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2010), no parece mostrarse como el método de elección en programas comerciales de TE, ya que la imposibilidad de organización del trabajo a partir de la aparición de celos espontáneos (en el caso de celos naturales), o a partir de celos inducidos escalonados (prostaglandinas), y las dificultades en la detección de los mismos, provoca porcentajes muy pobres de aprovechamiento de receptoras, lo que convierte en ineficaz a esta técnica reproductiva.

El **grupo 2** de nuestro estudio lo forman las hembras receptoras a las que se les ha aplicado uno de los tratamientos de sincronización con control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación: tratamiento C: (PRID[®] completo con cápsula de B₂), 102 receptoras, (60,78% de gestación) y tratamiento D: (P₄-12+GnRH), 50 receptoras, (62% de gestaciones) (Tabla 19). Dentro de este grupo, existen otros dos tratamientos, el E y F, que solo disponen de animales para el tratamiento postransferencia 2 del presente estudio.

Tabla 19: Grupo 2. Tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación.

Tratamientos de sincronización GRUPO 2	Transferencias n	Ges. n	% Ges.
C = PRID [®] completo	102	62	60,78
D = P ₄ -12+GnRH	50	31	62,00
TOTALES GRUPO 2	152	93	61,18

Prueba χ^2 de contingencia, no hay diferencias significativas en los porcentajes de gestación.

Nota: dentro de este grupo de tratamiento con control de la onda folicular y sin superovulación, existen otros dos tratamientos el E y F que solo disponen de animales para el tratamiento postransferencia 2 del presente estudio

En la comparación de frecuencias, no encontramos diferencias significativas (P>0,05), para los porcentajes de gestación, entre el tratamiento de sincronización C (PRID[®] completo) y el tratamiento de sincronización D (P₄-12+GnRH), (60,78% vs. 62%, respectivamente).

En el caso del tratamiento C, el uso de estrógenos y progestágenos para controlar el desarrollo folicular se basa en el potente efecto de la combinación de estos esteroides sobre las gonadotropinas (Bó *et al.*, 1994). El tratamiento conlleva la sincronización de la onda folicular ya que el B₂ (que lleva la cápsula del dispositivo vaginal), en presencia de P₄ produce una nueva onda folicular, de 3,5 a 5 días más tarde, con este intervalo, ya que se ha comprobado que puede existir una pequeña asincronía en la



emergencia de la onda folicular entre las receptoras dependiendo del momento del ciclo en el que se encuentren y del tiempo que tarde en disolverse en la vagina el B₂, que va en una cápsula (Moreno *et al.*, 2001; Bó *et al.*, 2002), el día 10 se induce la luteolisis con una PGF_{2α} y el día 12 se retira el dispositivo de P₄; el día 14 las receptoras están en celo, consiguiendo la sincronización de la ovulación.

El tratamiento D es muy similar al C con la diferencia de que usamos CIDR[®] en vez de PRID[®] y no usamos estrógenos para sincronizar la onda folicular. Colocamos el CIDR[®] durante 12 días, para obtener un folículo dominante grande, ya que un folículo grande se asocia con un CL grande, con mayor producción de P₄ y más posibilidades de gestación (Vasconcelos *et al.*, 2001; Lonergan and Evans, 2015), cuando retiramos el dispositivo de P₄; el día 10 aplicamos una PGF_{2α} para inducir la luteolisis y el día 14 aplicamos GnRH para inducir la ovulación, el día 14 prácticamente todas las receptoras están en celo.

Nuestros resultados presentan porcentajes de gestación muy aceptables y semejantes a los mostrados por los autores consultados para tratamientos de sincronización de receptoras en programas de TETF (Bó *et al.*, 2004a; Baruselli *et al.*, 2011; Bó *et al.*, 2013). La incorporación de los protocolos que controlan la dinámica folicular y la ovulación ofrece la ventaja de poder programar los tratamientos en momentos determinados, y no dependen de la pericia y exactitud en la observación de celos para realizar las transferencias siete días más tarde, con lo que logramos tener un mayor número de receptoras gestantes en el lote que hemos tratado.

Estos tratamientos C y D utilizados, son tratamientos de sincronización de receptoras que controlan farmacológicamente su dinámica folicular y su ovulación, con los que obtenemos en nuestro estudio semejantes porcentajes de gestación que los conseguidos con la PGF_{2α}, sin necesidad de detectar celos, con mayor porcentaje de aprovechamiento de las receptoras sincronizadas, y con los que logramos a la postre tener un mayor número de hembras receptoras gestantes en el lote que hemos tratado, razón por la cual se han impuesto en los programas comerciales de TE.

En el **grupo 3** para el tratamiento G (P₄E₂ 1.000 U.I. de eCG), se han realizado 449 transferencias con un 55,23% de gestaciones; para el tratamiento H (P₄E₂ 750U.I. de eCG), se han realizado 178 transferencias con un 55,62% de gestaciones y para el tratamiento I (P₄E₂ 325 U.I. de FSH/LH, Pluset[®]), se han realizado 269 transferencias con un 56,88% de gestaciones (Tabla 20).

Tabla 20: Grupo 3. Tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y con superovulación.

Tratamientos de sincronización GRUPO 3	Transferencias n	Ges. n	% Ges.
G = P ₄ E ₂ 1.000 U.I. eCG	449	248	55,23
H = P ₄ E ₂ 750 U.I. eCG	178	99	55,62
I = P ₄ E ₂ 325 U.I. FSH/LH (PLUSET [®])	269	153	56,88
TOTALES GRUPO 3 superovuladas	896	500	55,80

Prueba χ^2 de contingencia, no hay diferencias significativas en los porcentajes de gestación.

Dentro de este grupo de tratamiento de sincronización de receptoras 3, en el análisis realizado, no se han encontrado diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tres tipos de



tratamiento de sincronización; 52,23% para el tratamiento G (P_4E_2 1.000 U.I. de eCG); 55,62%, para el tratamiento H (P_4E_2 750 U.I. eCG); y 56,88% para el tratamiento I (P_4E_2 325 U.I. FSH/LH: Pluset[®]).

En este grupo de tratamientos con superovulación G y H, la ventaja de usar eCG es su bajo coste en comparación con la FSH, por otro lado, debido a la mayor persistencia en sangre de la eCG, una sola inyección i.m. es suficiente y finalmente, a dosis pequeñas, no es necesario el uso de anticuerpos anti eCG. La FSH, por su poca persistencia en sangre, necesita de aplicaciones cada 12 horas por lo que la dosis partida supone una ventaja frente a las 8 inyecciones i.m. de los protocolos clásicos, sin embargo su alto coste sin ofrecer mejores porcentajes de gestación, supone una gran desventaja en contra de su utilización en los protocolos de sincronización de receptoras.

El objetivo de estos tratamientos del grupo 3, es sincronizar la emergencia de la onda folicular e inducir una moderada superovulación en las receptoras, que consiga un mayor número de receptoras aptas para la transferencia, facilite la selección de éstas y aumente los niveles de P_4 en plasma que pueden aumentar su fertilidad. (Fuentes and de la Fuente, 1997; Fuentes, 2000; Binelli *et al.*, 2001; Baruselli *et al.*, 2001; Tríbulo *et al.*, 2002; Looney *et al.*, 2010).

Los resultados del tratamiento de superovulación de receptoras, descrito por nosotros (Fuentes and de la Fuente, 1997; Fuentes, 2000), se han visto confirmados por otros autores que han realizado el mismo tratamiento con pequeñas variaciones en el estrógeno usado y en la dosis de eCG. Baruselli *et al.* (2001), utilizaron B_2 y una dosis de 800 U.I. de eCG en novillas mestizas *Bos taurus* por *Bos indicus*; obtuvieron diferencias significativas entre el grupo tratado con eCG y el grupo control, en el número de CL, ($P < 0,01$); en las concentraciones de P_4 , ($P < 0,05$); en el porcentaje de novillas con CL, > 13 mm ($P < 0,01$); en la eficiencia del tratamiento en las gestantes sobre las tratadas ($P < 0,05$) y en los porcentajes de gestación, gestantes sobre transferidas, ($P < 0,01$). Tríbulo *et al.* (2002), utilizaron un dispositivo vaginal de P_4 , 2 mg i.m. de B_2 y 100 mg de P_4 i.m. en vacas mestizas de carne *Bos taurus* x *Bos indicus* y una dosis de 400 U.I. de eCG; el grupo control tiene el mismo tratamiento pero sin eCG; no observaron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con eCG para el porcentaje de receptoras transferidas respecto de las tratadas, pero sí obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de gestación respecto de las gestantes sobre las sincronizadas, ($P < 0,02$) y en el porcentaje de gestación respecto de las gestantes sobre las transferidas, ($P < 0,02$). Looney *et al.* (2010), en vacas mestizas *Bos taurus* x *Bos indicus* realizan un tratamiento experimental colocando en el día cero un dispositivo intravaginal de P_4 más P_4 y E_2 i.m.; en el día 5 administran 400 U.I. de eCG i.m.; el día 7 retiran el dispositivo de P_4 e inyectan una $PGF_{2\alpha}$ i.m.; 24 horas después de retirar el dispositivo de P_4 (día 8), administran 1 mg i.m. de E_2 y el día 9 las receptoras están en celo. El grupo control recibe el mismo tratamiento que el grupo experimental pero no se le administra eCG. Las transferencias se realizaron sin detección de celos en los dos grupos. Al igual que nosotros, obtuvieron diferencias significativas entre las receptoras transferidas sobre las tratadas, (83,7% vs. 74,9%) para el grupo experimental y el grupo control respectivamente ($P < 0,05$); no observaron diferencias significativas en los porcentajes de gestación respecto de las receptoras gestantes sobre las transferidas, en el grupo experimental y el grupo control (51,4% vs. 47,3%, respectivamente), ni en las gestantes sobre tratadas entre el grupo experimental y el grupo control (43% vs. 35,4%, respectivamente).



Las diferencias entre alguno de los trabajos anteriormente mencionados y nuestros resultados pueden deberse fundamentalmente a que se emplean embriones calidad 1 y 2 mientras que nosotros en nuestro estudio tan solo empleamos embriones calidad 1, al tipo de receptoras empleadas, vacas o novillas, cuando en nuestro trabajo solo empleamos novillas Frisonas de 14 a 17 meses de edad, a la raza de los animales utilizados, a la dosis empleada de eCG, al manejo y por último, a la experiencia del profesional que realiza la transferencia, en este sentido, Ponsart *et al.* (2000), obtuvo diferencias significativas entre los técnicos que realizaron las transferencias, y Hasler (2001), también encontró estas diferencias, circunstancia que no se contempla en nuestro estudio, ya que las 4.898 transferencias han sido realizadas por el autor del presente trabajo experimental.

A pesar de que la superovulación de receptoras produce más CL y consecuentemente más P₄ en sangre, no obtenemos mejores porcentajes de gestación, estos resultados sugieren la posible existencia de un umbral para la P₄ a partir del cual no es posible mejorar los porcentajes de gestación. Sin embargo, la superovulación de receptoras, tiene una serie de importantes ventajas frente a otros tratamientos de sincronización sin superovulación, así, el porcentaje de utilización de receptoras es superior al 80% y significativamente mejor que cuando se sincronizan con prostaglandinas, PRID[®] completo, o se usan celos naturales (P<0,001); es posible la TETF sin detección de celos, facilitando el manejo, sobre todo cuando se realizan lotes grandes de receptoras y se facilita la selección de las receptoras para la transferencia (Fuentes and de la Fuente, 1997; Fuentes, 2000).

Cuando se **analizan conjuntamente los tres grupos, grupos de tratamientos de sincronización de receptoras (1, 2 y 3)**, la comparación de frecuencias, tampoco encuentra diferencias significativas. Sin embargo, al aplicar el análisis de varianza (que incluye otros factores que pueden estar influyendo en los resultados), sí se encontraron diferencias significativas entre el **grupo 1** (prostaglandinas y celos naturales) (59,40%), con los tratamientos del **grupo 3** (tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y con superovulación), (55,80%) (P=0,0135).

De forma similar, al eliminar del análisis el efecto del grupo y analizar directamente el tipo de tratamiento de sincronización, aunque la comparación de frecuencias no mostró diferencias significativas entre ningún grupo, la comparación de mínimos cuadrados del análisis de varianza ha detectado diferencias significativas entre el tipo de tratamiento B (prostaglandinas) del grupo 1 y el tratamiento de sincronización, G (P₄E₂ 1.000 U.I. eCG) del grupo 3, (60,40% vs. 55,23% respectivamente) (P=0,0099), entre el tratamiento de sincronización B (prostaglandinas) del grupo 1 y el tratamiento de sincronización I (P₄E₂ 325 U.I. FSH/LH: Pluset[®]) del grupo 3, (60,40% vs. 56,88% respectivamente) (P=0,0238) y finalmente, se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos de sincronización de receptoras no superovuladas (grupo 1 + 2), con los tratamientos de sincronización de receptoras con superovulación (grupo 3) (59,60% vs. 55,80%, respectivamente), (P=0,0167). El resumen de estos resultados se muestran en la tabla 21.



Tabla 21: Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3. Total tratamientos de sincronización de receptoras con y sin control farmacológico de la onda folicular y con o sin superovulación.

Tratamientos de sincronización GRUPO 1	Transferencias n	Ges. n	% Ges.
A = Celos naturales	505	293	58,02
B = Prostaglandinas	697	421	60,40 ^c
TOTALES GRUPO 1	1.202	714	59,40^a
Tratamientos de sincronización GRUPO 2	Transferencias n	Ges. N	% Ges.
C = PRID [®] completo	102	62	60,78
D = P ₄ -12+GnRH	50	31	62,00
TOTALES GRUPO 2	152	93	61,18
Tratamientos de sincronización GRUPO 3	Transferencias n	Ges. N	% Ges.
G = P ₄ E ₂ 1.000 U.I. eCG	449	248	55,23 ^d
H = P ₄ E ₂ 750 U.I. eCG	178	99	55,62
I = P ₄ E ₂ 325 U.I. FSH/LH, Pluset [®]	269	153	56,88 ^e
TOTALES GRUPO 3 superovuladas	896	500	55,80^b
TOTALES GRUPO 1 no superovuladas	1.202	714	59,40
TOTALES GRUPO 2 no superovuladas	152	93	61,18
TOTALES GRUPO 1+2 no superovuladas	1.354	807	59,60^f
TOTALES GRUPO 1+2+3	2.250	1.307	58,09

Superíndices diferentes indican diferencias significativas (P=0,0135; P=0,0099; P=0,0238; P=0,0167)

Nuestros resultados, aún encontrando diferencias significativas a favor de los porcentajes de gestación hallados para las hembras del grupo 1 (prostaglandinas y celos naturales: 59,40%) con respecto al del grupo 3 (tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y con superovulación: 55,80%) (P=0,0135), y entre el porcentaje hallado en el grupo de prostaglandinas (A) con respecto al G y al I, muestran porcentajes de gestación tan aceptables en cada uno de los grupos analizados, que estamos de acuerdo con lo señalado por investigadores como Tríbulo, *et al.*, 2000; Baruselli, 2001 y Bó *et al.*, 2011, al afirmar que la incorporación de protocolos que controlan la dinámica folicular y la ovulación (con o sin superovulación), nos ofrece la ventaja de poder programar los tratamientos de sincronización, sin necesidad de detectar celos, ya que se consiguen porcentajes mayores de aprovechamiento de receptoras, y mayor número de receptoras gestantes, pues estos tratamientos aumentan el número de receptoras tratadas que reciben un embrión en protocolos de TETF.

IV.1.2.-Tipo de embrión

En nuestro estudio experimental, del total de los 2.250 embriones transferidos, 514 lo fueron en fresco; 1.096 congelados en glicerol y descongelados en pasos con soluciones decrecientes de glicerol y 640 en etilenglicol y transferidos directamente después de descongelarlos, sin extraer el crioprotector.

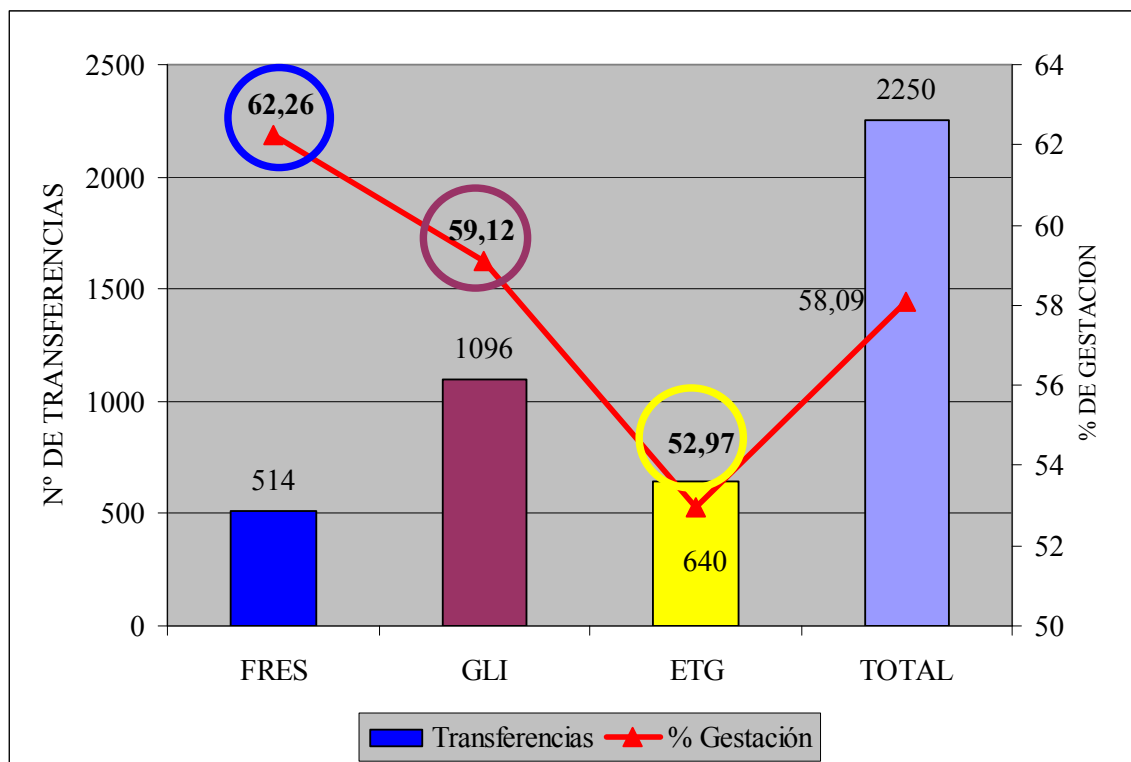


Con respecto al **tipo de embrión**, se encontraron diferencias significativas tanto en la comparación de frecuencias como en los resultados del análisis de varianza que mostraron diferencias altamente significativas entre los embriones transferidos FRE, que presentan los mejores porcentajes de gestación, con respecto a los congelados en ETG, (62,26% vs. 52,97%, respectivamente) (P=0,0007) y diferencias significativas entre los congelados en GLI y congelados en ETG, (59,12% vs. 52,97%, respectivamente), (P=0,0359). Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre FRE (62,26%) y congelados en GLI (59,12%), (Tabla 22 Gráfica 1).

Tabla 22: Total embriones transferidos en función del tipo de embrión, en el experimento 1.

	Transferidos n	% sobre el total	Gestantes n	% Ges.
FRESCOS	514	22,84	320	62,26 ^a
Congelados en GLICEROL	1.096	48,71	648	59,12 ^{a,b}
Congelados en ETILENGLICOL	640	28,44	339	52,97 ^c
Totales	2.250	100	1.307	58,09

Análisis de varianza: superíndices diferentes indican diferencias significativas. (P=0,0007, P=0,0359)



Gráfica 1: Porcentajes totales de gestación en función del tipo de embrión transferido.

Los resultados fueron ratificados en los análisis de varianza realizados dentro de cada grupo para tener en cuenta el efecto de los diferentes **tratamientos de sincronización**.

Los resultados se detallan en las tablas 23, 24 y 25 para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente (Gráficas 2, 3 y 4).

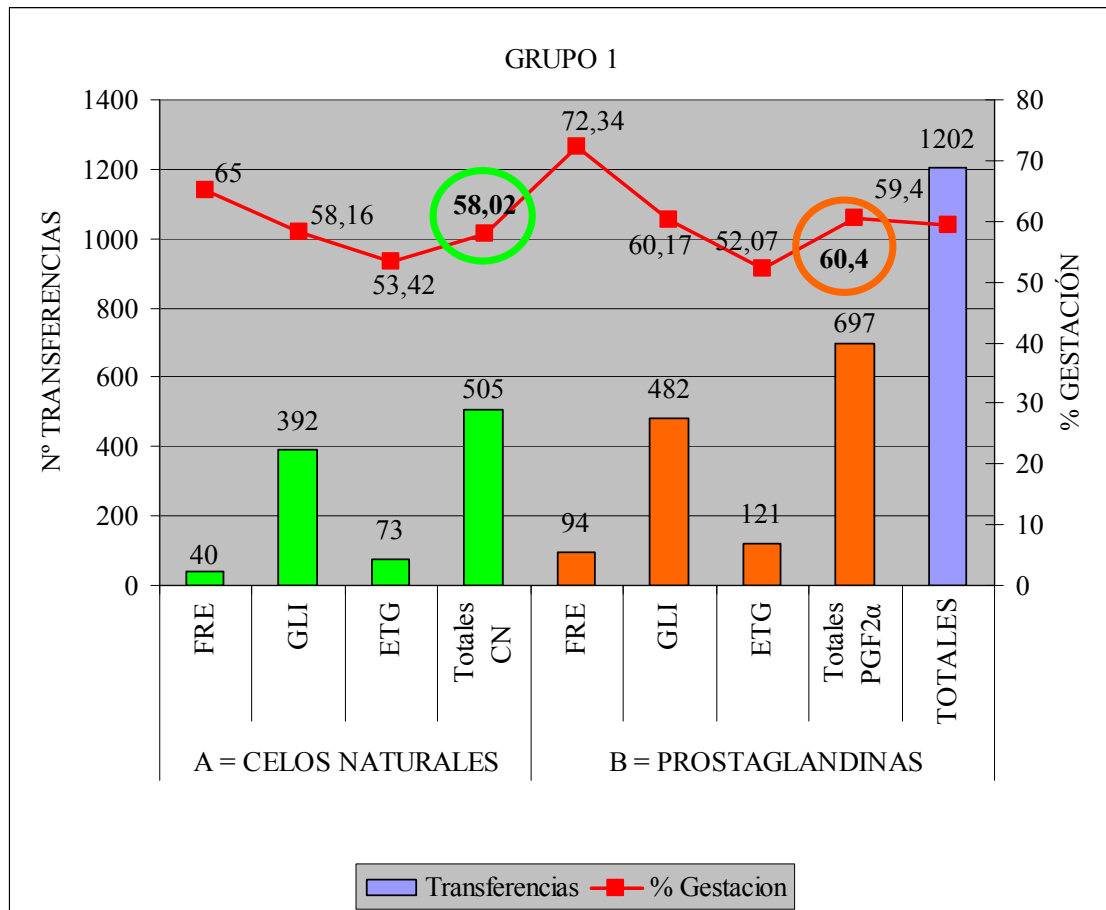


Si tenemos en cuenta los **tratamientos de sincronización** del experimento 1, en el análisis de varianza realizado en el **grupo 1**, se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre embriones transferidos en FRE y embriones congelados en ETG (70,15% vs. 52,58%, respectivamente) ($P=0,0002$); entre embriones transferidos en FRE y embriones congelados en GLI (70,15% vs. 59,27%, respectivamente) ($P=0,0174$) y entre embriones congelados en GLI y embriones congelados en ETG (59,27% vs. 52,58%, respectivamente) ($P=0,0106$). Es posible que la gran diferencia existente entre el número de transferencias en FRE ($n=134$) y congelados en GLI ($n=874$), sea determinante para que solo en este grupo se obtengan diferencias significativas entre FRE y GLI. (Tabla 23. Gráfica 2).

Tabla 23: Grupo 1. Porcentajes de gestación obtenidos en el grupo de tratamientos de sincronización de receptoras sin control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación según el tipo de embrión transferido.

Tratamientos de sincronización GRUPO 1	Tipo Embrión	Transferencias n	Ges. n	% Ges
A = Celos naturales	FRE	40	26	65,00
	GLI	392	228	58,16
	ETG	73	39	53,42
	Totales	505	293	58,02
B = Prostaglandinas	FRE	94	68	72,34
	GLI	482	290	60,17
	ETG	121	63	52,07
	Totales	697	421	60,40
Totales FRE		134	94	70,15 ^a
Totales GLI		874	518	59,27 ^b
Totales ETG		194	102	52,58 ^c
TOTALES GRUPO 1 receptoras no superovuladas		1.202	714	59,40

Análisis de varianza: superíndices diferentes indican diferencias significativas ($P<0,0002$; $P=0,0174$; $P=0,0106$).

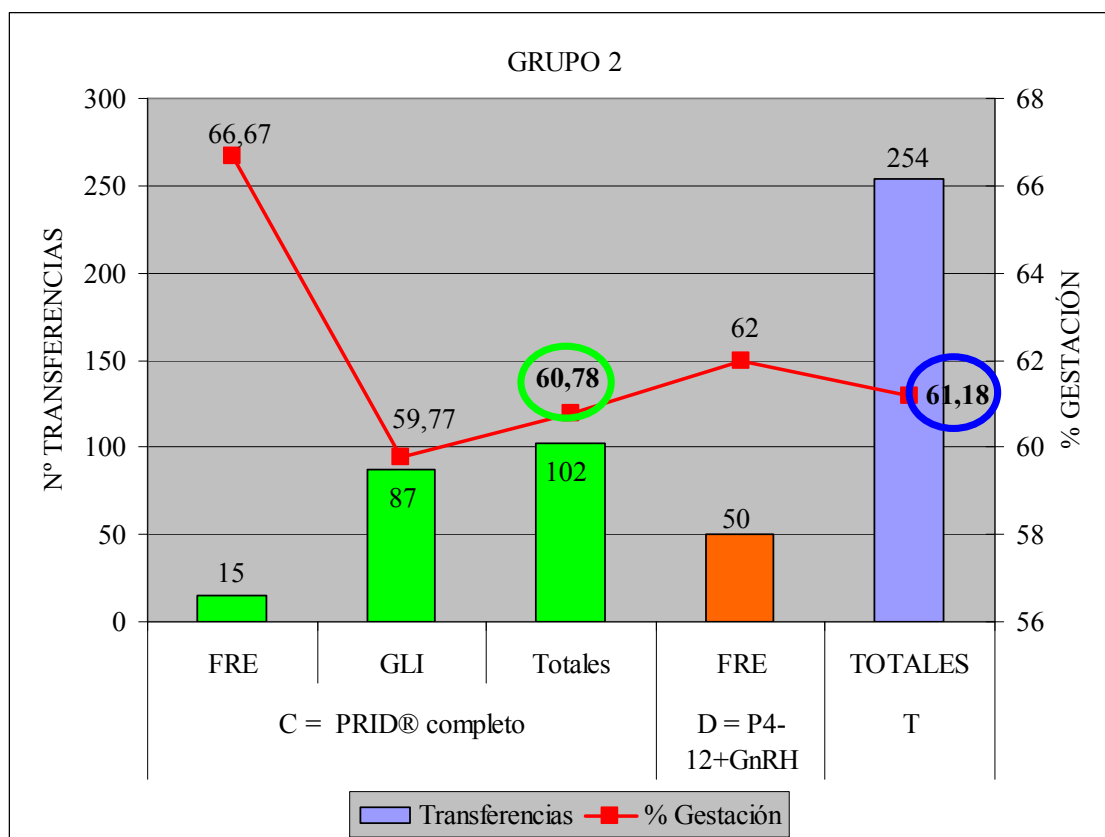


Gráfica 2: Grupo 1. Porcentajes de gestación obtenidos en los tratamientos de sincronización de receptoras sin control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación teniendo en cuenta el tipo de embrión transferido.

Dentro del **grupo 2** de tratamiento de sincronización de receptoras, con respecto al tipo de embrión, en el análisis de varianza realizado no se observan diferencias significativas entre los tratamientos C y D ni entre los embriones transferidos FRE o congelados en GLI (Tabla 24, Gráfica 3).

Tabla 24: Grupo 2. Tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación.

Tratamientos de sincronización GRUPO 2	Tipo Embrión	Transferencias n	Ges. n	% Ges.
C = PRID® completo	FRE	15	10	66,67
	GLI	87	52	59,77
	Totales	102	62	60,78
D = P ₄ -12+GnRH	FRES	50	31	62,00
TOTALES GRUPO 2 receptoras no superovuladas		152	93	61,18

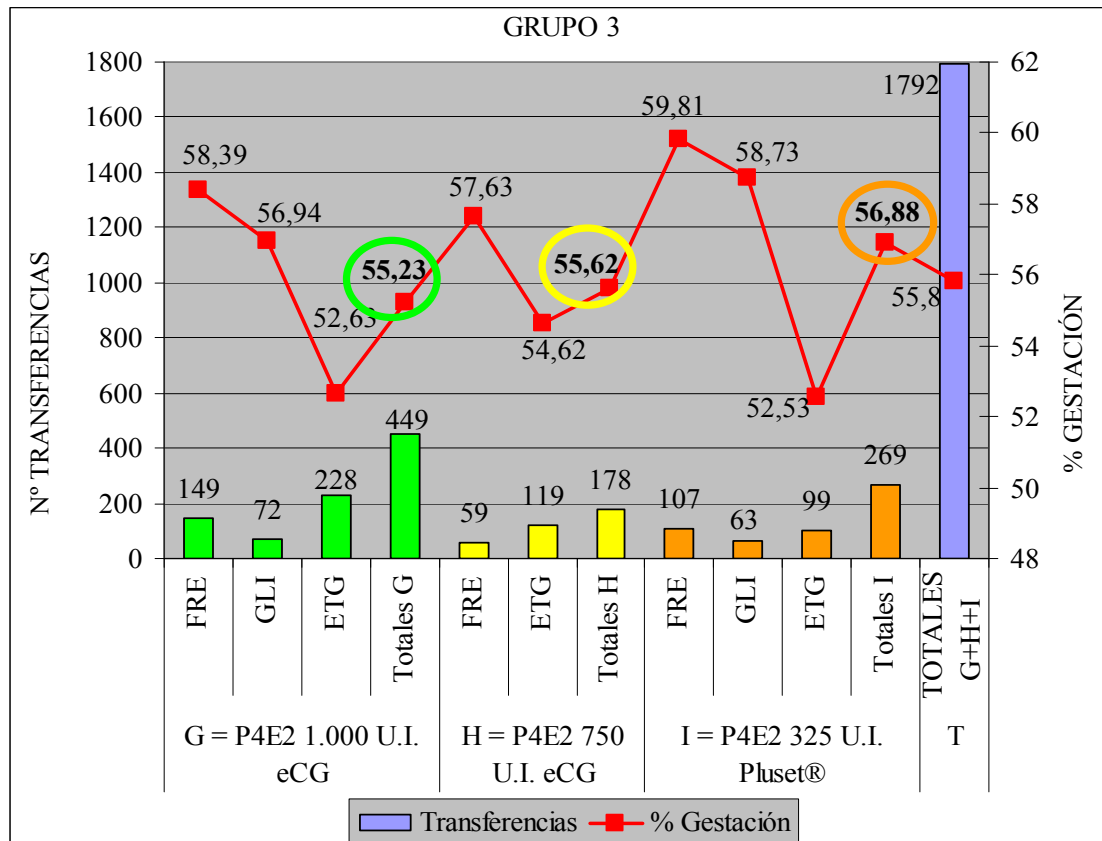


Gráfica 3: Grupo 2. Porcentajes de gestación obtenidos en los tratamientos de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y sin superovulación teniendo en cuenta el tipo de embrión transferido.

Si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en el **grupo 3** de tratamiento de sincronización con respecto al tipo de embrión, el análisis de varianza realizado no muestra diferencias significativas ($P > 0,05$) en los porcentajes de gestación en función del tipo de embrión, ya sea fresco o congelado (Tabla 25, Gráfica 4).

Tabla 25: Grupo 3. Tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y con superovulación.

Tratamientos de sincronización GRUPO 3	Tipo Embrión	Transferencias n	Ges. n	% Ges.
G = P ₄ E ₂ 1.000 U.I. eCG	FRES	149	87	58,39
	GLI	72	41	56,94
	ETG	228	120	52,63
	Totales	449	248	55,23
H = P ₄ E ₂ 750 U.I. eCG	FRES	59	34	57,63
	ETG	119	65	54,62
	Totales	178	99	55,62
I = P ₄ E ₂ 325 U.I. FSH/LH: Pluset®	FRES	107	64	59,81
	GLI	63	37	58,73
	ETG	99	52	52,53
	Totales	269	153	56,88
TOTALES GRUPO 3 receptoras superovuladas		896	500	55,80



Gráfica 4: Grupo 3. Porcentajes de gestación obtenidos en los tratamientos de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y superovulación, teniendo en cuenta el tipo de embrión transferido.

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo experimental, el mayor porcentaje de gestación se da en el grupo de hembras que han sido tratadas con prostaglandinas para sincronizar su celo y se les ha transferido un embrión fresco (72,34%) (Tabla 23).

Nuestro estudio muestra, según el análisis de varianza de los 2.250 embriones transferidos, que conseguimos mayores porcentajes de gestación si transferimos embriones FRE (62,26%), con diferencias altamente significativas ($P < 0,0007$) con respecto a transferirlos habiendo sido congelados en ETG y TD (52,97%). También obtenemos diferencias significativas en los porcentajes de gestación ($P < 0,0359$) entre los embriones congelados en GLI (59,12%), con los congelados en ETG y TD (52,97%); sin embargo, en nuestro estudio, no se han encontrado diferencias significativas entre FRE (320/514) (62,26%) y los congelados en GLI (648/1.046) (59,12%), probablemente por las importantes diferencias en el número de transferencias entre ambos. El hecho de que para los embriones congelados en GLI sea necesario retirar el crioprotector antes de la transferencia, permite la valoración posdescongelación de los mismos, impidiendo transferir embriones degenerados que según nuestros datos, pueden suponer un 2,52% del total, esto no ocurre con los embriones congelados en ETG y que se transfieren directamente, ya que en este caso, los embriones no se valoran después de la descongelación, por lo que un pequeño porcentaje de embriones congelados, que eran calidad 1, estarían degenerados y serían transferidos; probablemente este aspecto, hace que las diferencias en los porcentajes de



gestación entre GLI y ETG sean mayores que las esperadas si estuvieran exactamente en las mismas condiciones.

Por otra parte, el que exista un mayor porcentaje de gestación para las transferencias de embriones frescos frente a congelados, está en la línea de la mayoría de autores consultados que señalan que cuando los embriones que se transfieren son congelados, las porcentajes de preñez oscilan entre el 50 y 60%, levemente inferiores a los obtenidos con embriones frescos (Munar and Hasler, 1989; Munar *et al.*, 1998; Hill, 1996; Cabodevila, 1997; Nibart and Humblot, 1997; Dochi *et al.*, 1998; Beal *et al.*, 1998 y Cutini *et al.*, 1999).

En esta misma línea, Hasler (2001), en un estudio retrospectivo analizando los datos de la transferencia de embriones en distintos lugares y épocas desde el año 1988 al 1995, confirma una disminución en el porcentaje de gestación de transferir embriones frescos (68,30%, n=9.023) con respecto a congelados (56,10%, n=3.616) y en este mismo año Spell *et al.* (2001), observan la disminución del porcentaje de gestación en hembras receptoras del 83% con embriones frescos, al 69% si se utilizan embriones congelados.

Chebel *et al.* (2008), se manifiesta en el mismo sentido, pero encontrando diferencias muy significativas ($P < 0,01$), al afirmar que el porcentaje de gestación en hembras receptoras de embriones es correlativo a la calidad del embrión, la estación del año y si el embrión transferido es fresco o congelado; y Lee *et al.* (2012), también encuentra mayores porcentajes de preñez con embriones frescos en raza Holstein (60,60%,) con respecto a los congelados (53,9%).

Por último, en el trabajo reciente de Vieira *et al.* (2014), se ratifican estos resultados al encontrar mayores porcentajes de gestación en embriones transferidos en fresco frente a los congelados, ya sea diagnosticada la gestación en el día 31 o 45 postransferencia.

Nuestros datos muestran mejores resultados de gestación (con diferencias altamente significativas: $P < 0,001$), cuando transferimos embriones FRE, con respecto a los porcentajes que obtenemos con los embriones que habían sido congelados en ETG, estos resultados coinciden con los obtenidos por Lange (1995), después de transferir 16 hemibriones en fresco (68,7% de gestación) y congelados en 1,5 M ETG con los que obtiene un porcentaje de gestación bastante menor (37,5%).

Si tenemos en cuenta el crioprotector utilizado, en nuestros resultados se encuentran mejores porcentajes de gestación con embriones congelados en GLI respecto a los que lo son en ETG (59,12% vs. 52,97%, respectivamente), alcanzando diferencias significativas ($P = 0,0359$), tal como hemos señalado anteriormente, debemos tener en cuenta que los embriones congelados en ETG, se transfieren directamente, sin evaluación posdescongelación, lo que hace posible la transferencia de un pequeño porcentaje de embriones muertos o degenerados.

Si comparamos nuestros datos con otros autores de la bibliografía consultada, observamos que existen resultados contradictorios, así, nuestros datos están muy en concordancia, en cuanto a mayor porcentaje de gestación logrado con embriones que se congelan en GLI respecto a los logrados con ETG, con el trabajo de Looney *et al.* (1996), donde se señalan también diferencias significativas ($P < 0,05$) y con el estudio de



Arreseigor *et al.* (1998), cuando analiza embriones procedentes de hembras supervuladas *Bos indicus* que presentaban un porcentaje de gestación muy significativamente menor si se congelaban en ETG, respecto al porcentaje alcanzado con los que se habían congelado en GLI (15,4% vs. 32,9%, respectivamente) ($P < 0,01$); sin embargo, nuestros resultados no estarían de acuerdo con lo hallado por este mismo autor en el mismo trabajo, al no encontrar diferencias significativas en los porcentajes de gestación descritos para embriones procedentes de hembras *Bos taurus* que habían sido congelados en los mismos crioprotectores, lo que también está confirmado en los estudios de Nibart and Humblot (1997) y Dochi *et al.* (1998).

Nuestros resultados también serían contrarios a lo expuesto por Ponsart *et al.* (2000), en una recopilación de datos de 2.134 transferencias entre 1996 y 1998, donde obtuvieron diferencias significativas entre embriones congelados en ETG y GLI, con porcentajes de gestación mayores para el ETG frente a los obtenidos con el GLI y con diferencias significativas (55,4% vs. 47,2%, respectivamente) ($P < 0,03$). En este mismo estudio, también encontraron diferencias significativas entre los técnicos que realizaron las transferencias ($P < 0,001$), pero en nuestro caso, todas las transferencias han sido realizadas por el mismo técnico, autor del presente estudio, por lo que este factor de variación, está descartado.

En cualquier caso, estamos totalmente de acuerdo con lo que señala Hasler en 2014, en su estudio retrospectivo de 40 años de trasplante de embriones en ganado vacuno, donde afirma que el porcentaje de gestación alcanzado por embriones congelados con respecto a los transferidos frescos, difieren prácticamente en solo diez puntos menos y los porcentajes de gestación conseguidos son lo suficientemente buenos, (ya sea con GLI con ETG), como para que la crioconservación de embriones se haya convertido en un elemento crucial y beneficioso en los programas comerciales de TE en esta especie, y pone de manifiesto que más del 99% de los embriones de razas cárnicas, y el 94% de embriones de razas lecheras en EEUU (datos de la asociación americana de trasplante de embriones, 2009), fueron congelados en ETG, ya que la posibilidad de la TD ofrece muchas ventajas en la aplicación en el campo, sobretodo nos proporciona un importante ahorro en tiempo, material y medios.

IV.1.3.- Estado de desarrollo del embrión

De los 2.250 embriones que se han transferido en el grupo de tratamientos de sincronización de receptoras (1, 2 y 3); 1.146 (50,93%) fueron mórulas compactadas “4”; 634 (28,18%) jóvenes blastocistos “5”; 312 (13,87%) blastocistos “6” y 158 (7,02%) blastocistos expandidos “7”. (Tabla 26. Gráfica 5).

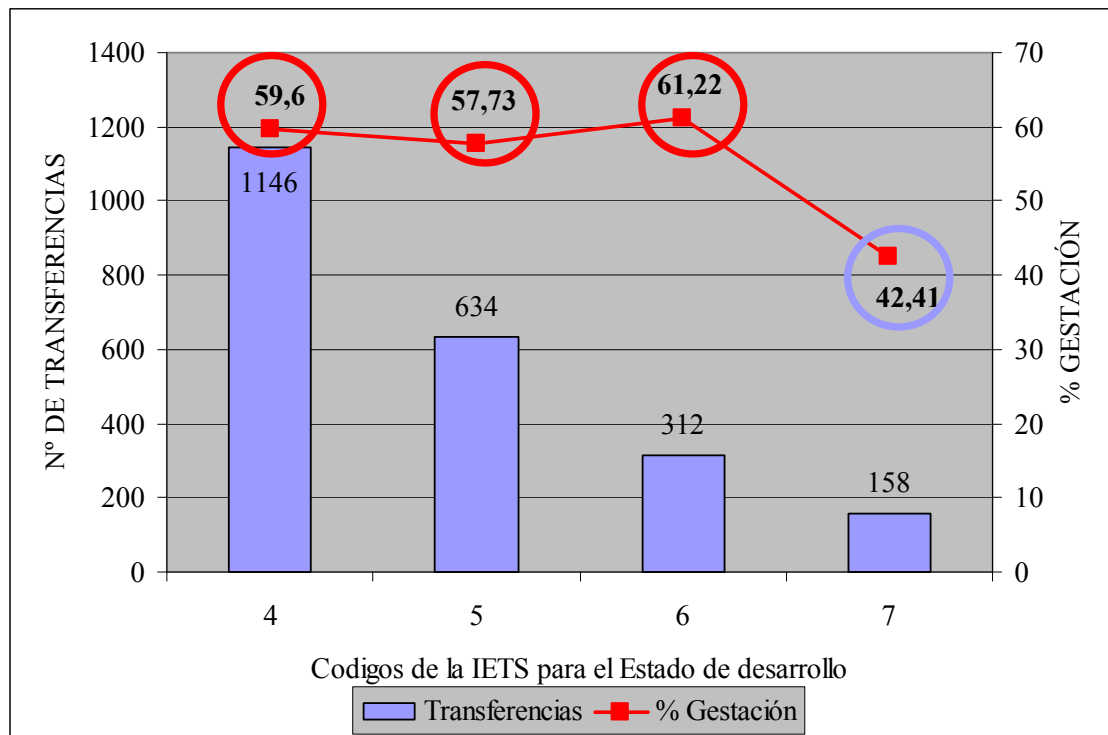
Para el estado de desarrollo del embrión, se encontraron diferencias significativas tanto en la comparación de frecuencias como en el análisis de varianza. Así, se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre mórulas compactadas y blastocistos expandidos, (59,60% vs. 42,41%, respectivamente) ($P < 0,0001$); entre jóvenes blastocistos y blastocistos expandidos, (57,73% vs. 42,41%, respectivamente) ($P = 0,0002$), y entre blastocistos y blastocistos expandidos, (61,22% vs. 42,41%, respectivamente) ($P < 0,0001$), (Tabla 26, Gráfica 5).



Tabla 26: Porcentajes de gestación obtenidos en función del estado de desarrollo del embrión y grupo de tratamiento.

Estado de desarrollo	Transferencias n.	% sobre el total	Gestantes n	% Ges.
Mórula compactada "4"	1.146	50,93	683	59,60 ^a
Joven Blasto "5"	634	28,18	366	57,73 ^{ab}
Blastocisto "6"	312	13,87	191	61,22 ^{a,b,c}
Blastocisto expandido "7"	158	7,02	67	42,41 ^d
Totales	2.250	100,00	1.307	58,09

Análisis de varianza: superíndices diferentes indican diferencias significativas. ($P < 0,0001$; $P = 0,0002$; $P = 0,0001$).



Gráfica 5: Porcentajes de gestación según el estado de desarrollo de los embriones en el grupo de tratamientos de sincronización de receptoras.

El análisis individualizado, realizado dentro de cada grupo mostró que en el **grupo 1** de tratamiento de sincronización para el análisis de varianza en relación al estado de desarrollo del embrión, se encontraron diferencias significativas, en los porcentajes de gestación, entre mórulas compactadas y blastocistos expandidos (61,38% vs. 40,87%) ($P < 0,0001$); entre jóvenes blastocistos y blastocistos expandidos (62,10% vs. 40,87%) ($P < 0,0001$), y entre blastocistos y blastocistos expandidos (59,76% vs. 40,87%) ($P = 0,0025$); en el **grupo 2**, no encontramos diferencias significativas en los porcentajes de gestación en función del estado de desarrollo del embrión, y finalmente, dentro del **grupo 3** se han encontrado diferencias significativas en el porcentaje de gestación entre mórulas compactadas y blastocistos expandidos (56,76% vs. 44,83%) ($P < 0,0001$); entre jóvenes blastocistos y blastocistos expandidos (50,98% vs. 44,83%) ($P = 0,0002$), y entre blastocistos y blastocistos expandidos (64,52% vs. 44,83%) ($P < 0,0001$).



Así, excepto en el grupo 2, se obtienen diferencias significativas en el porcentaje de gestación según el estado de desarrollo del embrión, obteniendo siempre menor porcentaje de gestación con los blastocistos expandidos, por lo que se decidió realizar dos estudios adicionales (Tabla 27):

1. Comparar, entre los embriones transferidos en FRE, los resultados obtenidos con blastocistos expandidos y los obtenidos con mórulas compactadas, jóvenes blastocistos y blastocistos.
2. Comparar, dentro de los blastocistos expandidos los resultados obtenidos con embriones tipo FRE con los obtenidos con blastocistos expandidos congelados.

Tabla 27: Resultados de gestación en función del estado de desarrollo y tipo de embrión.

Estado de desarrollo	Frescos			Congelados		
	Transf. n	Ges. n	%Ges	Transf. n	Ges. n	%Ges.
Blastocistos expandidos	81	58	71,6 ^a	161	64	39,75 ^b
Mórulas compactadas	637	405	63,38			
Jóvenes Blastocistos	311	196	63,02			
Blastocistos	147	90	61,22			
Total	1.095	691	63,11			

Análisis de varianza: superíndices diferentes indican diferencias significativas. (P<0,0001).

En el análisis de varianza realizado se han observado los siguientes resultados:

1. Hay diferencias significativas en los porcentajes de gestación (71,6% vs. 39,75%) (P<0,0001), entre los blastocistos expandidos transferidos en fresco y congelados.
2. No se han encontrado diferencias significativas en la calidad de los CL en los blastocistos expandidos entre frescos y congelados.
3. Dentro de las transferencias en fresco, no se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre los blastocistos expandidos, mórulas compactadas, jóvenes blastocistos y blastocistos, ni en la calidad del CL.

El efecto que puede llegar a tener el estado de desarrollo del embrión sobre los porcentajes de gestación alcanzados en las receptoras ha sido estudiado en diversos trabajos con resultados diferentes, mientras algunos autores encuentran que los mayores porcentajes de gestación se alcanzan con los blastocistos tempranos y blastocistos, con respecto a mórulas y blastocistos expandidos (Hasler *et al.*, 1987), otros autores, encontraron mejores porcentajes de gestación con blastocistos que con mórulas (Wright, 1981; Looney *et al.*, 1984; Donaldson, 1985; Nishigai *et al.*, 2003).

Dochi *et al.* (1998), observa que las mórulas y blastocistos tempranos presentaban mayores porcentajes de gestación que los blastocistos y blastocistos expandidos y en cambio, otros autores no han hallado diferencias significativas en los porcentajes de



gestación debido al efecto del estado de desarrollo del embrión, como Lee *et al.*, (2012), que no encuentran diferencias significativas en los porcentajes de preñez obtenidos en estado de mórula compactada, blastocisto temprano, y blastocisto expandido, a pesar de que éste último presentaba los índices más bajos de preñez de todos los grupos (51,9%).

Sin embargo Nishigai (2003), en vacas de carne negras japonesas, encuentra diferencias significativas en embriones congelados de calidad excelente en los porcentajes de gestación alcanzados entre el estado de blastocisto con respecto a los encontrados para la mórula compactada (81,00% vs. 62,0%, respectivamente) ($P < 0,05$). Hasler (2001), también encuentra diferencias significativas en embriones congelados entre mórulas y jóvenes blastocistos (54,3% vs. 59,7% respectivamente) ($P < 0,05$), y Bó *et al.* (2012), sobre 1.333 embriones congelados en ETG y TD y transferidos a receptoras *Bos indicus* por *Bos taurus*, en la misma granja, obtiene diferencias significativas ($P < 0,05$) en los porcentajes de gestación entre mórulas compactadas, jóvenes blastocistos y blastocistos, (55,4%, 59,4% y 52%, respectivamente), frente a los blastocistos expandidos con un 39,7%.

Hasler (2014) señala en un análisis retrospectivo hecho sobre 72.000 transferencias de embriones congelados que el estado de desarrollo “7” tienen un porcentaje de gestación más bajo (43,8%), que los obtenidos en los estadios “4”, “5” y “6” (53,7%, 55,3% y 52,1%, respectivamente); Vieira *et al.* (2014) también observa este hecho, ya que en su estudio los blastocistos expandidos presentan un porcentaje de gestación del 25,2%, más bajo que el obtenido para mórulas (33,3%); joven blastocisto (32,6%) y blastocisto (34,4%).

Nuestros resultados muestran que cuando los blastocistos expandidos se transfieren en fresco, no hay diferencias significativas entre los porcentajes de gestación alcanzados por ellos, con las mórulas compactadas, jóvenes blastocistos y blastocistos, incluso son mayores (71,6%) (Tabla 27), sin embargo, parece ser que la congelación afecta al embrión en estado de blastocisto expandido disminuyendo dramáticamente los porcentajes de gestación (39,75%), con diferencias altamente significativas ($P < 0,0001$); Es posible que al ser un embrión de mayor tamaño y con mayor masa celular, el crioprotector no proporcione una buena protección, o al menos, no la proporcionada en estadios de desarrollo en donde el tamaño es menor. Bó *et al.* (2013), afirman que los blastocistos expandidos tienen células con distintos grados de desarrollo, diferenciación y sensibilidad que los estadios más tempranos, además de tener un gran blastocelo lleno de líquido, y en general, sus células son más diferenciadas, lo que les haría más sensibles a la difusión de agua y crioprotectores hacia dentro y fuera del embrión durante el congelado y descongelado, aunque esta hipótesis requiere de más investigación; en este mismo sentido se expresa Hasler (2014), al afirmar que futuras investigaciones sobre el desarrollo de un protocolo de congelación de los blastocistos expandidos se hacen necesarias.

IV.1.4.- Calidad del Cuerpo Lúteo por exploración manual

Los datos de la calidad del CL se han determinado en este estudio, por exploración rectal, ya que durante nuestro trabajo, desde que se empezó a ecografiar en el año 2009, las transferencias en receptoras ecografiadas solo se han realizado cuando presentaban un CL excelente o regular; además, independientemente del tratamiento de sincronización realizado, todos los datos que tenemos de receptoras ecografiadas



corresponden a hembras que recibieron el tratamiento postransferencia 2 para mejorar la fertilidad, lo que puede modificar los resultados frente a una situación sin tratamiento postrasferencia y por lo tanto, introducen factores de confusión que hacen imposible cualquier comparación en las variables estudiadas. Por esta razón, no se han incluido estos datos en el presente trabajo experimental.

Tabla 28: Porcentajes de gestación obtenidos en función de la calidad del CL determinado por exploración manual vía rectal y el tipo de embrión (FRE, GLI, ETG).

TIPO DE EMBRIÓN	CALIDAD DEL CUERPO LÚTEO		
	Calidad 1 Excelentes	Calidad 2 Regulares	Calidad 3 Malos
FRESCOS			
Transferencias (n)	37	84	30
Gestaciones	27	60	19
% gestación	72,97	71,43	63,33
GLICEROL			
Transferencias (n)	231	480	250
Gestaciones	152	308	110
% gestación	65,8 ^c	64,17 ^c	44 ^d
ETILENGLICOL			
Transferencias (n)	55	106	33
Gestaciones	30	57	15
% gestación	54,54	53,77	45,45
TOTALES			
Transferencias(n)	323	670	313
Gestaciones	209	425	144
% gestación	64,71 ^a	63,43 ^a	46,01 ^b

Análisis de varianza: en filas, superíndices diferentes indican diferencias significativas (P<0,0001)

En el análisis realizado para la calidad del CL por exploración manual, solo se han tenido en cuenta las receptoras, no ecografiadas, de los tratamientos de sincronización de los grupos 1 y 2. Se han descartado los datos de los tratamientos de sincronización de receptoras del grupo 3 (con superovulación), para trabajar únicamente con aquellos datos procedentes de receptoras no superovuladas y evaluar de manera objetiva las calidades de los cuerpos lúteos. En total, se han clasificado 1.306 receptoras en tres categorías, siguiendo la clasificación de Nieman *et al.* (1985), excelentes (calidad 1) n = 323 (24,73%); regulares (calidad 2) n = 670 (51,30%) y malos (calidad 3) n = 313 (23,97%), (Tabla 28, Gráfica 6).

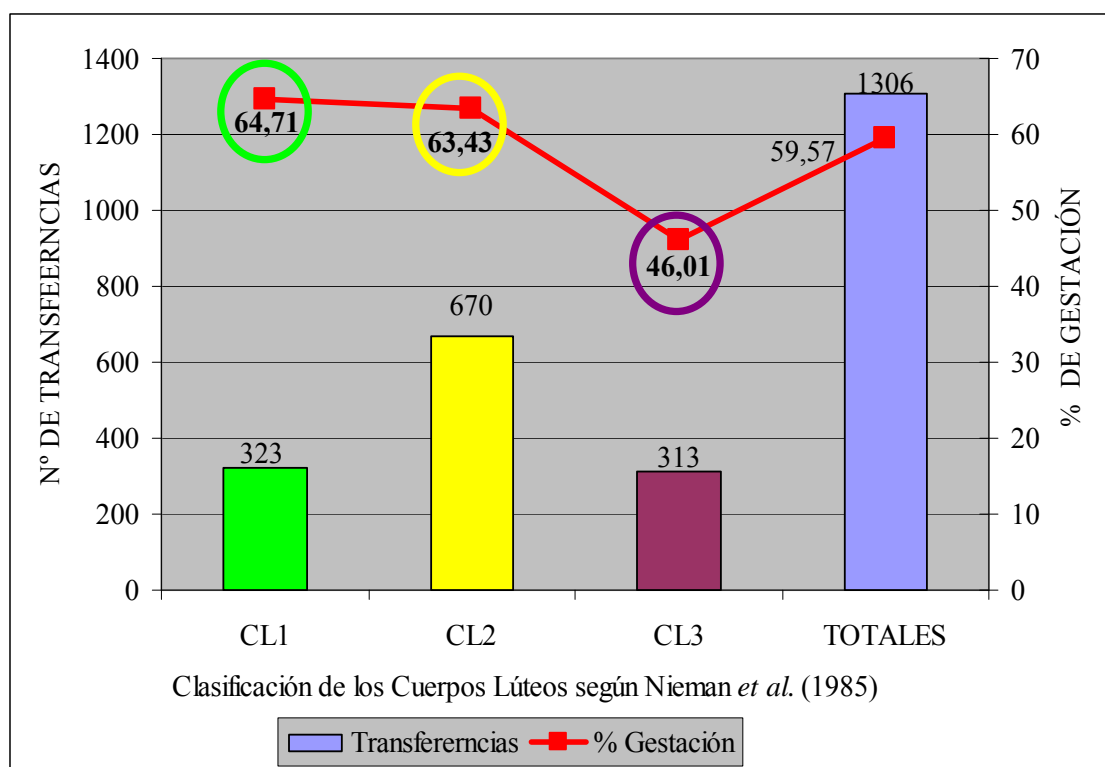
En el análisis de varianza realizado se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes totales de gestación, entre los CL calidad 1 y calidad 3, (64,71% vs. 46,01%, respectivamente) (P<0,0001), y entre los CL calidad 2 y calidad 3, (63,43% vs. 46,01%, respectivamente) (P<0,0001); pero no entre los CL calidad 1 y calidad 2, (64,71% vs. 63,43%, respectivamente).



Analizando los datos dentro de cada tipo de embrión se encuentra que:

1. Para los embriones transferidos en FRE, no se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre receptoras con CL calidad 1, 2 y 3 ($P > 0,05$).
2. Para los embriones transferidos en GLI se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre los CL calidad 1 y 3, (65,8% vs. 44%, respectivamente) ($P < 0,0001$), y entre los CL calidad 2 y 3, (64,17% vs. 44%, respectivamente) ($P < 0,0001$).
3. Para los embriones congelados en ETG, no se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de gestación para los CL calidad 1, 2 y 3 ($P > 0,05$).

En el análisis realizado dentro de cada grupo de tratamientos, se observan en el grupo 1 (celos naturales y prostaglandinas), diferencias significativas entre los CL calidad 1 y calidad 3, (64,58% vs. 45,95% respectivamente) ($P < 0,0001$) y entre los CL calidad 2 y calidad 3, (63,43% vs 45,95% respectivamente) ($P < 0,0001$); pero no entre los calidad 1 y los calidad 2. En el grupo de tratamientos 2, no se han encontrado diferencias significativas.



Gráfica 6: Porcentajes de gestación según la calidad del CL por exploración manual.

Considerar la calidad del cuerpo lúteo a partir de su tamaño y consistencia como factor a tener en cuenta en el éxito de la elección de las receptoras parece adecuado, sin embargo, no siempre es posible establecer una relación significativa entre la calidad del cuerpo lúteo y la gestación (Hasler *et al.*, 1987; Liebrich, 1991; Bó *et al.*, 1999). Además hay que considerar que la exploración rectal del CL es una técnica muy



subjetiva en la que la experiencia del técnico tiene una gran importancia como se ha podido demostrar en diferentes trabajos, así Ponsart *et al.* (2000) y Hasler (2001), encuentran diferencias significativas entre los diferentes técnicos que realizan las transferencias.

Algunos estudios han sugerido que un mayor tamaño del CL mantendría una más alta concentración de progesterona en el diestro, provocando un mayor porcentaje de gestación después de la transferencia (Ambrose *et al.*, 1999; Baruselli *et al.*, 2010), pero contrariamente, trabajos anteriores no podían establecer la correlación positiva entre el tamaño del CL, la concentración plasmática de progesterona con los porcentajes de gestación de las receptoras (Hasler *et al.*, 1987; Looney *et al.*, 2006; Spell *et al.*, 2001).

Además, debemos señalar que una limitación de este estudio es el hecho de que la clasificación del CL se hace por palpación rectal, es evidente que el uso de la ecografía mejoraría la exactitud de la selección, aumentaría las receptoras aptas para la transferencia y se podría mejorar la fertilidad de las receptoras. En esta fase de nuestro estudio, debido a la subjetividad de la exploración manual de los CL, vía rectal y a pesar de que todas las exploraciones han sido realizadas en el presente trabajo experimental por el mismo profesional, no obtuvimos diferencias entre los CL calidad 1 y 2; este resultado se puede deber a que la tendencia general, con este método de clasificación de CL, es a ser conservador, es decir, calificar más CL como calidad 2 (51,30%), que como calidad 1 (24,73%), sin embargo, tal y como se observa posteriormente, los porcentajes de gestación son prácticamente idénticos entre los dos grupos (64,71% para los CL calidad 1 y 63,43% para los CL calidad 2), lo que hace pensar que probablemente, en el grupo de CL de calidad 2, haya un alto porcentaje que serían realmente CL de calidad 1, si se hubieran podido evaluar con técnicas más objetivas.

En este sentido, Beal (1999), realiza un estudio para demostrar la subjetividad en la exploración rectal; selecciona por ecografía 402 receptoras con CL ≥ 13 mm con o sin cavidad y pared >3 mm y homogénea alrededor de la cavidad, por lo tanto, todos los animales tenían CL de buena calidad (1 o 2); las receptoras se exploraron manualmente por un técnico con experiencia, sin conocer los resultados de la ecografía, por este método manual, se calificaron 118 receptoras como excelentes (29,35%), 163 (40,54%) son calificadas como regulares y 121 (30,1%) como malas; los porcentajes de gestación fueron del 72% para el grupo excelente, 67% para el grupo regular y 79% para el grupo malo. En este experimento además de demostrar la subjetividad de la exploración rectal como método de clasificación de CL, se obtuvieron unos porcentajes de gestación altos en los tres grupos, ya que todas las receptoras puestas a la exploración manual tenían, en realidad, CL de buena calidad, es decir, eran “buenas receptoras”.

Nuestros resultados están en concordancia con la mayoría de autores consultados que parecen establecer una correlación entre el diámetro o volumen del CL de la receptora presentado en el momento inmediatamente anterior a la transferencia y los porcentajes de gestación alcanzados, en esta línea Baruselli *et al.* (2001), realiza el seguimiento de la estructuras ováricas por medio de ultrasonografía a un grupo de 140 animales, y encuentra que los CL de más de 2cm de diámetro, producen niveles de progesterona circulantes de 2,44 ng/ml, y un porcentaje de concepción del 58% en hembras a las que se le transfirió un embrión el día siete postcelo; a las hembras que se les encontraron CL de 1,5 cm de diámetro, producen niveles de progesterona circulantes de 1,75 ng/ml, y un porcentaje de concepción del 41%; finalmente, a las hembras a las que se les



encontraron cuerpos lúteos menores de 1,5 cm de diámetro, presentaron niveles de progesterona circulantes de 1,19 ng/ml, y un porcentaje de concepción del 31%, hallando diferencias significativas ($P < 0.05$).

En concordancia Siqueira *et al.* (2009a y 2009b), afirma que la probabilidad de gestación está influenciada por el tamaño del CL ($P < 0,05$) y Nogueira *et al.* (2012), encuentra también diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las medidas de los diámetros de los CL en receptoras que resultaron preñadas, con respecto a las vacías ($2,03 \pm 0,41$ cm vs. $1,86 \pm 0,34$ cm respectivamente).

Por último, y también de acuerdo con nuestros resultados, Vieira *et al.* (2014), encuentra mejores porcentajes de gestación con diferencias muy significativas en receptoras que presentaban CL bueno con respecto a los mostrados en receptoras que presentaban CL malos.

IV.2.- EXPERIMENTO 2: Tratamientos de postransferencia para mejorar los porcentajes de gestación

IV.2.1. Tratamiento postransferencia 1: DP₄₋₇

Consiste en la aplicación el día de la transferencia de un dispositivo vaginal de P₄ durante 12 días, con el objetivo de aumentar los niveles de P₄ durante el período crítico del reconocimiento materno de la gestación.

Este tratamiento postransferencia 1 se aplica a 303 receptoras sincronizadas con los tratamientos del grupo 1, que mostraron un porcentaje de gestación del 58,42% y a 541 receptoras superovuladas con los diferentes tratamientos del grupo 3 con un 54,9% de gestaciones. El total del tratamiento postransferencia 1 (DP₄₋₇) está formado por 844 receptoras con un 56,16% de gestaciones (Tablas 29, 30 y 31. Gráficas 7, 8 y 9).

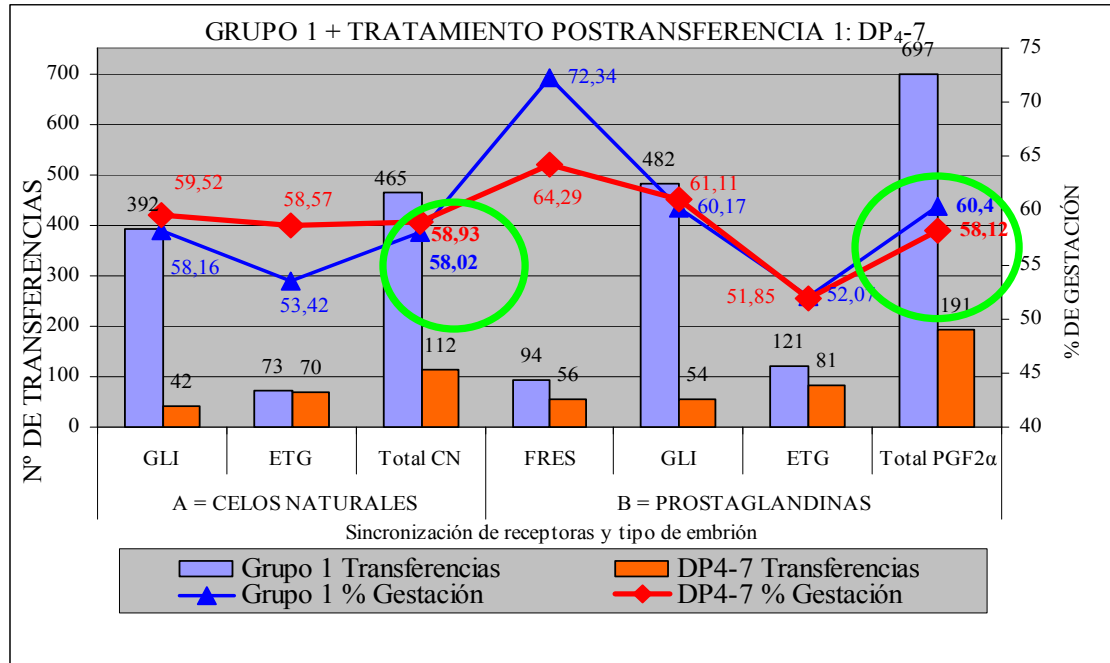
Tabla 29: Tratamiento postransferencia 1. DP₄₋₇ en receptoras del grupo 1 de tratamientos de sincronización (Observar también Gráfica 7).

GRUPO 1 Sin tratamiento postransferencia					GRUPO 1 + Tratamiento postransferencia 1 DP ₄₋₇		
Tratamientos	Tipo Embrión	Transferencias n.	Ges. n	% Ges.	Transf. N	Ges. N	% Ges.
A= Celos naturales	GLI	392	228	58,16	42	25	59,52
	ETG	73	39	53,42	70	41	58,57
	Totales	465	267	58,02	112	66	58,93
B=Prostaglandinas	FRE	94	68	72,34	56	36	64,29
	GLI	482	290	60,17	54	33	61,11
	ETG	121	63	52,07	81	42	51,85
	Totales	697	421	60,40	191	111	58,12
Total receptoras		1.162	688	59,20	303	177	58,42



Se han comparado las hembras con tratamientos de sincronización de receptoras del grupo 1 y 3 (sin tratamiento postransferencia), (tablas 29 y 30), con las que se les había aplicado estos mismos tratamientos de sincronización, más el tratamiento postransferencia 1 (DP₄₋₇). La tabla 29 y la Gráfica 7, muestran los resultados correspondientes al análisis realizado para el grupo 1.

En el análisis realizado para este grupo de receptoras no superovuladas, no se han encontrado diferencias significativas entre el grupo 1 y el tratamiento postransferencia 1 (DP₄₋₇), para los porcentajes de gestación totales, (59,20% vs. 58,42% respectivamente) (P>0,05).



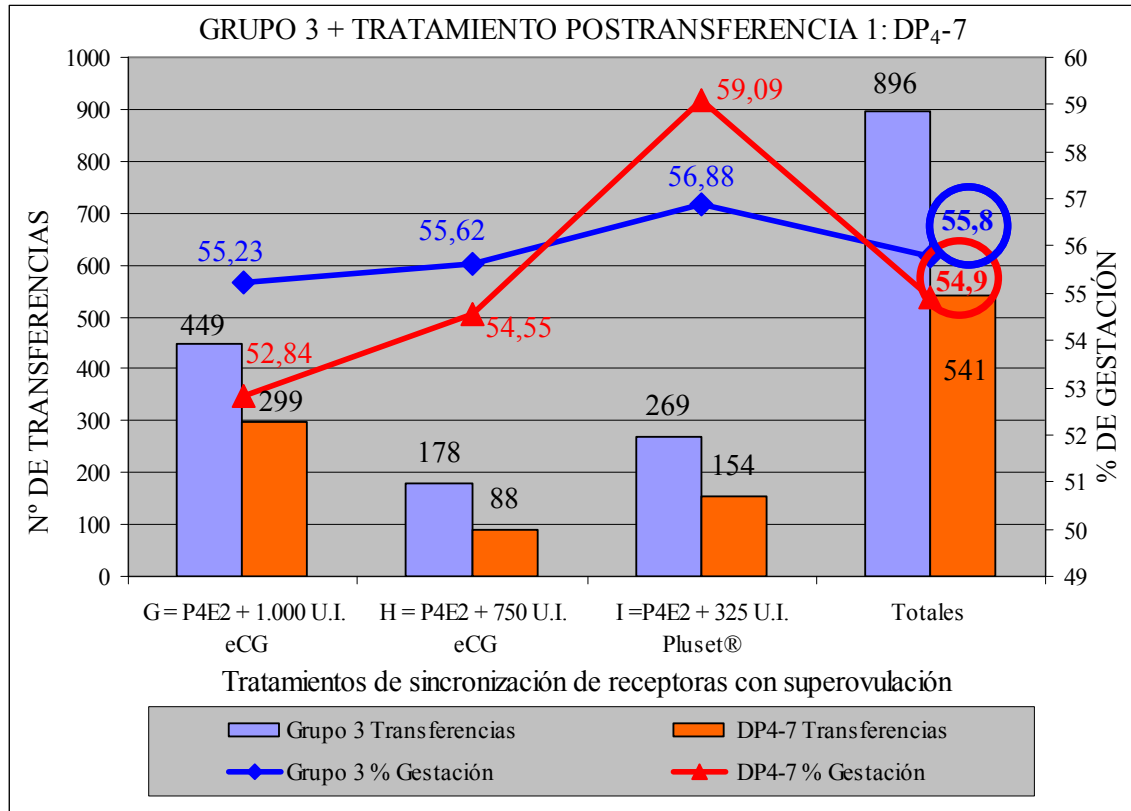
Gráfica 7: Porcentajes de gestación entre el grupo 1 y el tratamiento postransferencia 1 (DP₄₋₇), en función del tipo de embrión.

Tabla 30: Tratamiento postransferencia 1. DP₄₋₇ en receptoras del grupo 3 de tratamientos de sincronización (Observar también Gráfica 8).

GRUPO 3 Sin tratamiento postransferencia					GRUPO 3 + Tratamiento postransferencia 1 DP ₄₋₇		
Tratamientos	Tipo Embrión	Transf. n	Ges. n	% Ges.	Transf. n	Ges. n	% Ges.
G= P ₄ E ₂ + 1.000 U.I. eCG	FRES	149	87	58,39	74	43	58,11
	GLI	72	41	56,94	46	24	52,17
	ETG	228	120	52,63	179	91	50,84
	Totales	449	248	55,23	299	158	52,84
H= P ₄ E ₂ + 750 U.I. eCG	FRES	59	34	57,63	41	24	58,54
	GLI	119	65	54,62	47	24	51,06
	Totales	178	99	55,62	88	48	54,55
I= P ₄ E ₂ + 325 U.I. FSH/LH Pluset®	FRES	107	64	59,81	52	31	59,62
	GLI	63	37	58,73	41	26	63,41
	ETG	99	52	52,53	61	34	55,74
	Totales	269	153	56,88	154	91	59,09
Total receptoras grupo 3		896	500	55,80	541	297	54,90



En el análisis realizado para el grupo de receptoras superovuladas, no se han encontrado diferencias significativas entre el grupo 3 sin tratamiento postransferencia y el grupo 3 más tratamiento postransferencia 1 (DP₄₋₇), para los porcentajes de gestación totales, (55,80% vs. 54,90% respectivamente), (P>0,05), (Tabla 30, Gráfica 8).

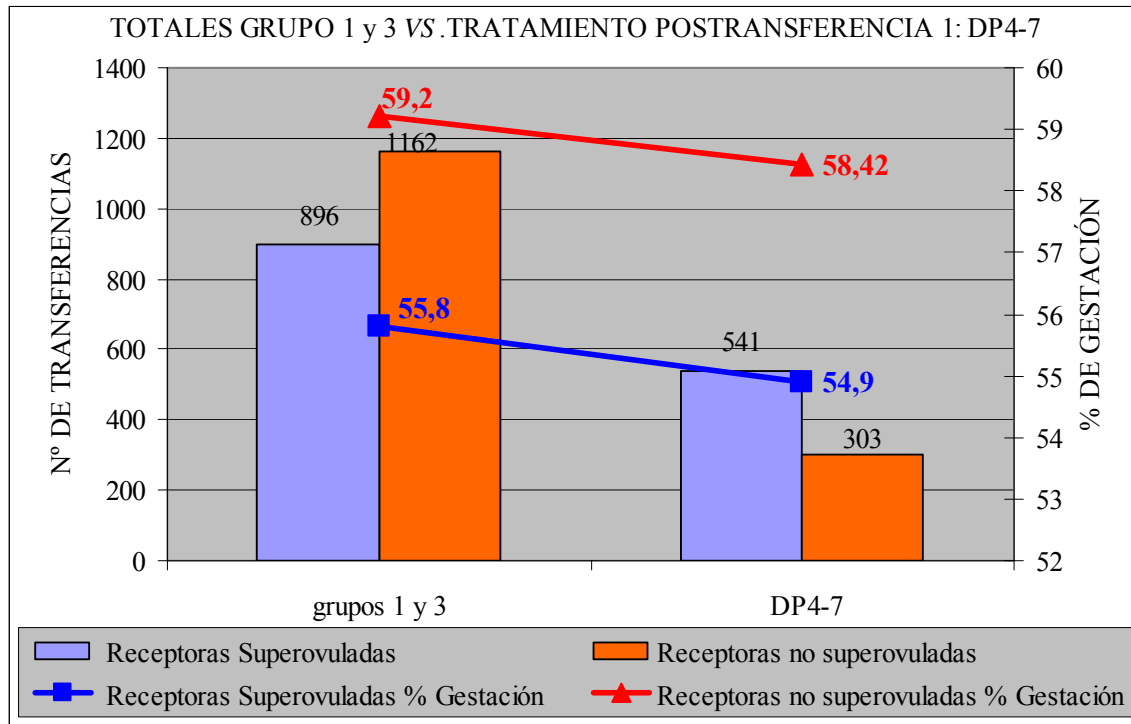


Gráfica 8: Porcentajes de gestación entre el grupo de tratamientos de sincronización de receptoras 3 (receptoras superovuladas) y el tratamiento postransferencia 1 (DP₄₋₇).

Analizando conjuntamente los grupos 1 y 3 y el tratamiento postransferencia 1 (DP₄₋₇), no se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de sincronización de receptoras; ni entre el grupo de receptoras superovuladas (54,90%) y no superovuladas (58,42%); ni en el estado de desarrollo de los embriones, ni en el tipo de embrión, (Tabla 31 Gráfica 9).

Tabla 31: Total tratamientos de sincronización de receptoras sin y con tratamiento postransferencia 1 DP₄₋₇ (Observar también Gráfica 9).

GRUPO 1 y 3 Total tratamientos de sincronización de receptoras con o sin superovulación y sin tratamiento postransferencia				GRUPO 1 y 3 + Tratamiento postransferencia 1 DP ₄₋₇		
Grupo	Transf. n	Ges. n	% Ges.	Transf. n	Ges. n	% Ges.
Total receptoras superovuladas	896	500	55,80	541	297	54,90
Total receptoras no superovuladas	1.162	688	59,20	303	177	58,42
TOTALES	2.058	1.188	57,73	844	474	56,16



Gráfica 9: Porcentajes totales de gestación entre receptoras superovuladas y no superovuladas, (grupos 1 y 3) y el tratamiento posttransferencia 1 (DP₄₋₇)

El periodo crítico alrededor de la etapa de reconocimiento y adhesión del embrión al endometrio uterino durante la implantación, determina la necesidad de un estricto sincronismo entre el embrión trasplantado y su receptora, de tal manera que se debe garantizar el mantenimiento de la estructura y funcionalidad del CL, que genera una continua producción de P₄ para el mantenimiento del ambiente embriotrófico que apoye el normal desarrollo del embrión (Binelli *et al.*, 2001; Mann y Lamming, 2001), pero debemos señalar que la comunicación entre el embrión y el útero, no siempre tiene éxito, lo que desencadena grandes pérdidas embrionarias (Binelli *et al.* 2001).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se podría pensar que proporcionar fuentes directas o indirectas de P₄ a hembras durante los primeros días de preñez, haría disminuir el porcentaje de pérdidas embrionarias, ya que se mejoraría el ambiente uterino en donde el embrión tendría un desarrollo adecuado y mayor síntesis y secreción de IFN- τ , pues esta secreción, está influenciada por el estado de desarrollo embrionario (Walker *et al.*, 2009).

Sin embargo, la relación entre el porcentaje de preñez y la concentración plasmática de P₄ de acuerdo al tamaño del CL en receptoras de embriones bovinos, ha sido objeto de debate en varios estudios realizados, mientras algunos investigadores han verificado la correlación positiva, encontrando que a mayor área del CL, mayor es la concentración de P₄ plasmática y consecuentemente, mayor es el porcentaje de preñez (Kastelic *et al.*, 1990; Macmillan *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 2001; Bó *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2007); otros comprueban que la P₄ exógena mediante dispositivos vaginales aplicados entre el día 3 y 7 del ciclo, aumenta significativamente la concentración de P₄ en suero, (P < 0,05), a partir del día 3,5 en adelante, y está asociado a un incremento del tamaño del embrión en el día 13 (P=0,034) y en el día 16 (P=0,012) (Carter *et al.*, 2008), sin embargo, otros afirman que a pesar de los efectos



positivos de la administración de P₄ exógena, mediante dispositivos vaginales, sobre el desarrollo del embrión en las primeras fases (Clemente *et al* 2009), no parece que ello se relacione con mayores porcentajes de gestación. Otros autores consultados sugieren que la P₄ exógena puede tener efectos adversos sobre el CL, y en este sentido O'Hara *et al.* (2013), demostraron que la P₄ exógena, si se administra en el metaestro temprano (durante los días 3-7) y por un período corto, tiene efectos beneficiosos sobre el desarrollo del embrión (mayor longitud en el día 16 y mayor concentración de ITF- τ), pero efectos potencialmente adversos sobre el CL, que posee menor peso en el día 14, lo que se correlaciona con el descenso de P₄ entre el día 9 y 14

En la misma línea que los datos que nosotros mostramos también se encuentran los estudios de Tríbulo *et al.* (1997), que no hallaron diferencias significativas en novillas mestizas, entre las que recibieron un CIDR[®] el día de la transferencia durante 12 días y las que no lo recibieron, o los de Purcell *et al.* (2005), que en vacas y novillas de carne a las que se transfirieron embriones frescos o congelados de calidad 1 o 2, no mostraron diferencias significativas entre el grupo control (sin P₄ exógena) y el que recibió un CIDR[®] durante 13 días colocado el día de la transferencia, obteniendo unos resultados de gestación del 70% sin CIDR[®] vs. 65% con CIDR[®], respectivamente; estos resultados también concuerdan plenamente con los que señalan en un trabajo reciente Monteiro *et al.* (2015), al afirmar que los porcentajes de gestación eran más bajos en las vacas Holstein receptoras de embriones si recibían P₄ exógena, mediante un CIDR[®] respecto a los mostrados por las vacas del grupo control.

La explicación al hecho de que no encontremos diferencias significativas en los porcentajes de gestación del grupo de sincronización de receptoras sin tratamiento postransferencia con los del grupo con tratamiento postransferencia 1 (DP₄₋₇), la podemos encontrar en lo que dice Marques *et al.* (2012), al afirmar que es posible que aumentando la progesterona, no se puedan mejorar porcentajes de gestación cercanos al 60%.

También Binelli *et al.* (2001), afirman que en el periodo crítico de RMG (días 15-17) una alta concentración de E₂ en sangre puede favorecer la síntesis de PGF_{2 α} , ejerciendo un efecto negativo sobre la fertilidad. Cuando colocamos un dispositivo vaginal de P₄ el día de la transferencia (día 7) y lo retiramos el día 19, tendremos en el periodo crítico de RMG un folículo dominante y una alta concentración de E₂ en sangre, por lo que es probable que el efecto negativo que éstos pueden ejercer en ese momento, no nos permita mejorar la fertilidad.

IV.2.2. Tratamiento postransferencia 2. DP₄₋₇+ GnRH

Este tratamiento postransferencia 2, (DP₄₋₇+ GnRH), lo forman 304 receptoras no superovuladas y sincronizadas con los tratamientos del grupo 1, con un 64,47% de gestaciones; 430 receptoras no superovuladas y sincronizadas con los tratamientos del grupo 2, con un 63,95% de gestaciones y 834 receptoras superovuladas y sincronizadas con los tratamientos del grupo 3, con un 62,71% de gestaciones. En total 1.568 receptoras con un 63,39% de gestaciones (Tablas 32, 33 y 34. Gráficas 10, 11, 12 y 13).

Se han comparado los tratamientos de sincronización de receptoras del grupo 1, 2 y 3, sin tratamiento postransferencia, con las receptoras que se les ha aplicado los mismos



tratamientos de sincronización, pero añadiendo el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GnRH).

Tabla 32: Tratamiento postransferencia 2 DP₄₋₇ + GnRH en receptoras del grupo 1 y 2 de tratamientos de sincronización y no superovuladas.

GRUPOS 1 y 2 sin tratamiento postransferencia. Tratamientos de sincronización de receptoras con o sin control de la onda folicular. y sin superovulación					GRUPOS 1 y 2 + Tratamiento postransferencia 2 DP ₄₋₇ + GNRH		
Tratamientos	Tipo de Embrión	Transf n	Ges. n	% Ges.	Transf n	Ges. n	% Ges.
A= Celos naturales	ETG	73	39	53,42	93	61	65,59
B= Prostaglandinas	FRES	94	68	72,34	43	30	69,77
	GLII	482	290	60,17	61	42	68,85
	ETG	121	63	52,07	107	63	58,88
	Totales	697	421	60,40	211	135	63,98
Totales Grupo 1 Sin control de la onda folicular		770	460	59,74	304	196	64,47
C= PRID [®] completo	Glicerol	87	52	59,77	87	54	62,07
D= P ₄ 12+GnRH	FRES	50	31	62,00	139	95	68,35
E = P ₄ 12+ 500 U.I. eCG	ETG				111	71	63,96
F = P ₄ 12+ 75 U.I FSH/LH	ETG				45	26	57,78
	ETG				48	29	60,42
Totales Grupo 2 Con control de la onda folicular		137	83	60,58	430	275	63,95
Total receptoras no superovuladas		907	543	59,87	734	471	64,17

En el análisis realizado para los grupos 1 y 2 (receptoras no superovuladas), no se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes totales de gestación entre los grupos de tratamientos de sincronización de receptoras, sin tratamiento postransferencia y con tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇ + GNRH), (59,87% vs. 64,17%, respectivamente) (P>0,05); ni para los totales de los diferentes tratamientos realizados.

A pesar de ello, se observa una tendencia a que con este tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇ + GNRH), el porcentaje de gestación sea superior en todos los casos excepto en el tratamiento B y tipo de embrión FRE.

En todos los tratamientos del grupo (1, 2) y del tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇ GNRH), tenemos porcentajes de gestación cercanos y superiores al 60%, es muy probable que el aumento de progesterona no se traduzca en un aumento significativo de las gestaciones, (Marques *et al* 2012). También podemos intuir que la GnRH aplicada en el día de la transferencia, día 7 y en el día 17, actúa como habíamos previsto, aumentando el porcentaje de gestaciones, al contrario de lo que pasaba cuando no se administraba GnRH, pasando de (58,42%) en tratamiento postransferencia 1 (DP₄₋₇), a (64,17%), para el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇ + GNRH).



Tabla 33: Tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇ + GnRH) en receptoras del grupo de tratamientos de sincronización y superovuladas.

GRUPO 3. Sin tratamiento postransferencia. Tratamiento de sincronización de receptoras con control de la onda folicular, con superovulación					GRUPO 3 + Tratamiento postransferencia 2 (DP ₄₋₇ + GnRH)		
Tratamientos	Tipo Embrión	Transf N	Ges. n	% Ges.	Transf n	Ges. N	% Ges.
G = P ₄ E ₂ +1.000 U.I. eCG	FRES	149	87	58,39	76	50	65,79
	GLI	72	41	56,94	124	77	62,10
	ETG	228	120	52,63	191	115	60,21
	Totales	449	248	55,23 ^d	391	242	61,89 ^c
H = P ₄ E ₂ +750 U.I. eCG	FRES	59	34	57,63	65	45	69,23
	ETG	119	65	54,62	91	54	59,34
	Totales	178	99	55,62 ^f	156	99	63,46
I = P ₄ E ₂ +325 U.I. FSH/LH	FRES	107	64	59,81	57	39	68,42
	GLI	63	37	58,73	73	43	58,90
	ETG	99	52	52,53	74	46	62,16
	Totales	269	153	56,88 ^g	204	128	62,75
J = GNRH+750 U.I. eCG	ETG				83	54	65,06 ^e
Total receptoras superovuladas		896	500	55,80 ^b	834	523	62,71 ^a

Análisis de varianza: dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias significativas. (P=0,0035; P=0,0381; P=0,0178; P=0,01386; P=0,0443; P=0,0248)

Los análisis de varianza muestran que:

1. Existen diferencias significativas para los porcentajes totales de gestación entre el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GNRH) y el grupo 3 de sincronización de receptoras, sin tratamiento postransferencia, (62,71 vs. 55,80%, respectivamente) (P<0,0035).
2. Se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de gestación, entre el tratamiento de sincronización G (P₄E₂+1.000 U.I. eCG) más el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GNRH) y el mismo tratamiento de sincronización sin tratamiento postransferencia (61,89%, vs. 55,23%, respectivamente) (P=0,0381).
3. Existen diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre el tratamiento de sincronización J (GnRH+750 U.I eCG) más el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GNRH) y el tratamiento de sincronización G (P₄ E₂+1.000 U.I. eCG), sin tratamiento postransferencia, (65,06% vs 55,23%, respectivamente) (P=0,0178).
4. Se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre el tratamiento de sincronización J (GnRH+750 U.I eCG) más el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GNRH) y el tratamiento de



sincronización H (P₄ E₂+750 U.I eCG), sin tratamiento postransferencia, (65,06% vs 55,62%, respectivamente) (P=0,0386).

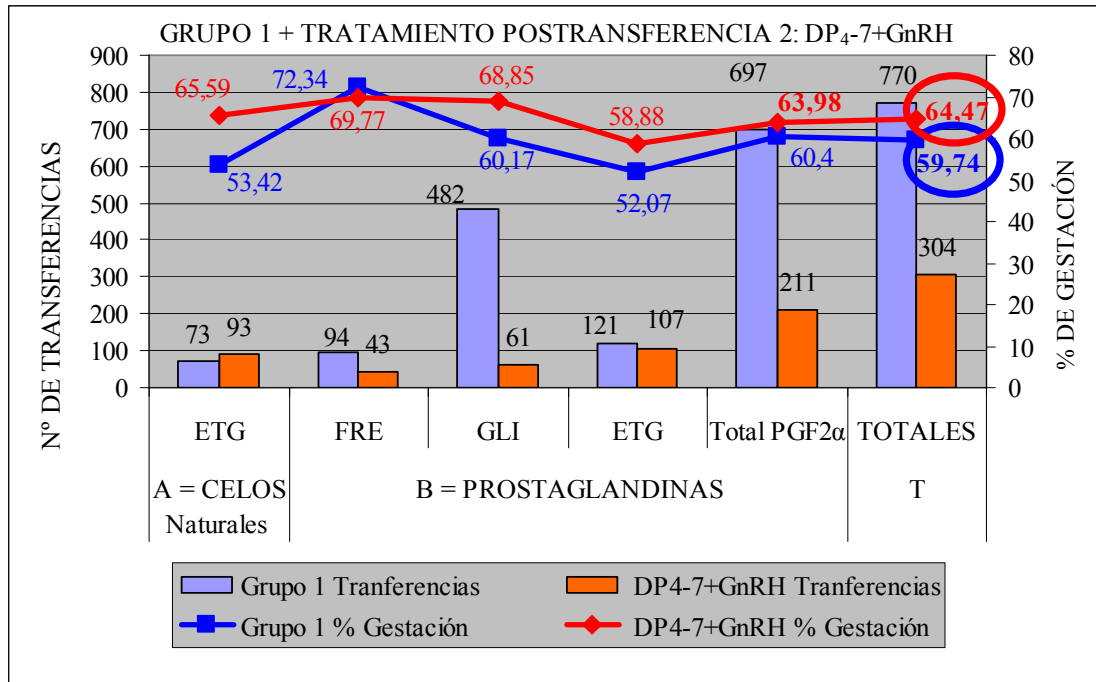
- Se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre el tratamiento de sincronización J (GnRH+750 U.I eCG) más el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GnRH) y el tratamiento de sincronización I (P₄ E₂+325 U.I FSH/LH: Pluset®), sin tratamiento postransferencia, (65,06% vs. 56,88%, respectivamente) (P=0,0443).

Tabla 34: Total tratamientos de sincronización de receptoras sin y con tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇ + GnRH).

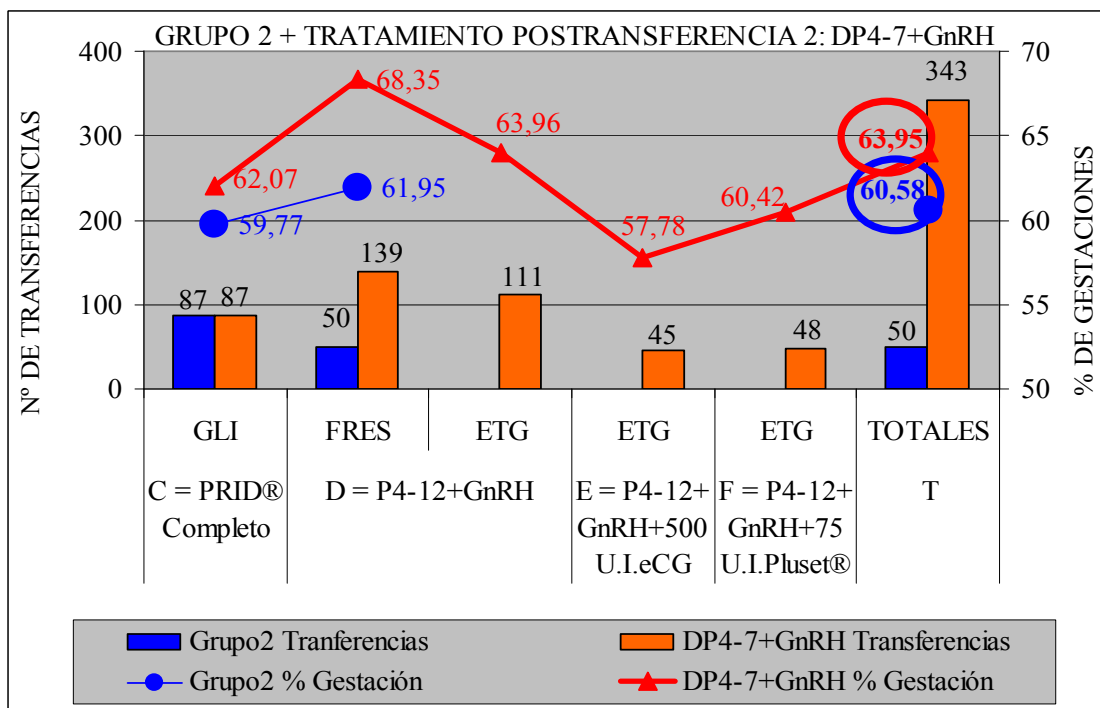
GRUPO 1, 2 y 3. Sin tratamiento postransferencia. Total tratamientos de sincronización de receptoras con o sin superovulación				GRUPO 1, 2 y 3 + Tratamiento postransferencia 2 (DP ₄₋₇ + GnRH)		
Grupo	Transf n	Ges. n	% Ges.	Transf n	Ges. n	% Ges.
Total receptoras superovuladas	896	500	55,80 ^b	834	523	62,71 ^a
Total receptoras no superovuladas	907	543	59,87	734	471	64,17
TOTALES	1.803	1.043	57,85 ^d	1.568	994	63,39 ^c

El análisis de varianza de todo el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GnRH) y el grupo 1, 2 y 3 de sincronización de receptoras (Tabla 34), indica que:

- Hay diferencias muy significativas, (P=0,0248), para los porcentajes totales de gestación, entre el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GnRH) y los totales de los grupos 1, 2 y 3 de sincronización de receptoras, (63,39% vs. 57,85%, respectivamente).
- En el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GnRH), se han encontrado diferencias significativas en función del tipo de embrión, entre los transferidos en FRE, (n=259/380) (68,16%), y los congelados en ETG, (n=519/843) (61,57%) (P=0,0291).
- En el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GnRH), no se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de sincronización de receptoras; ni entre el grupo de receptoras superovuladas (62,71%), y no superovuladas (64,17%).



Gráfica 10: Porcentajes de gestación entre el el tratamiento posttransferencia 2 (DP₄-7+GnRH) y el grupo de tratamientos de sincronización 1, en función del tipo de embrión.



Gráfica 11: Porcentajes de gestación entre el tratamiento posttransferencia 2 (DP₄-7+GnRH) y el grupo de tratamientos de sincronización 2, en función del tipo de embrión.

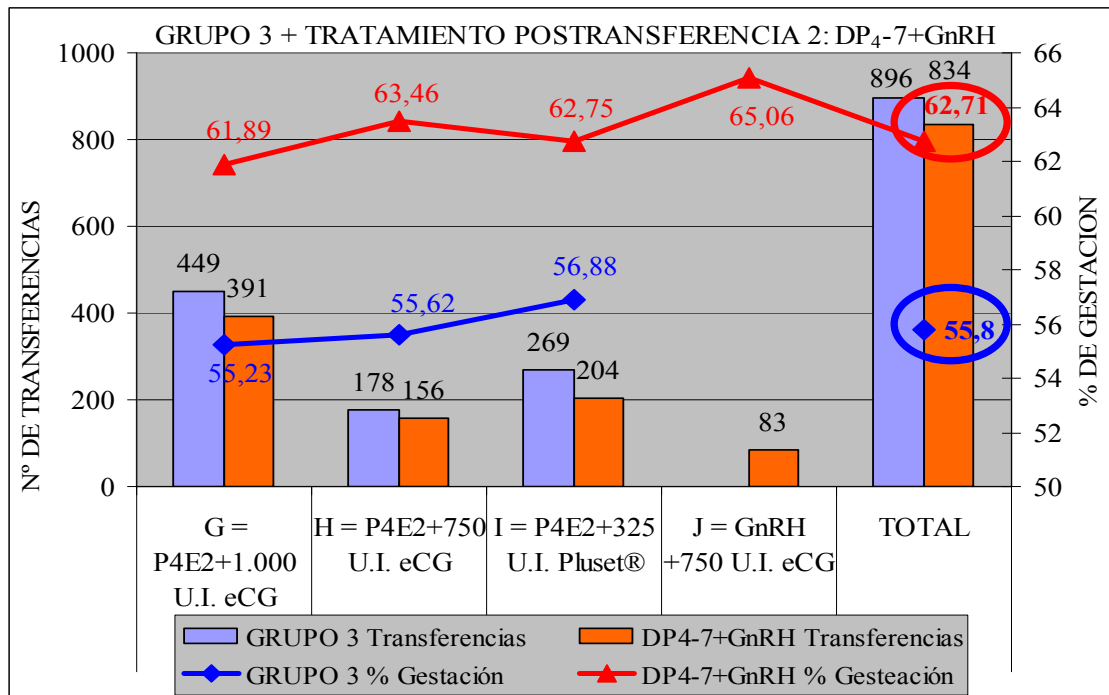
En el período crítico del reconocimiento maternal de la gestación, los días 15-17, es importante tener niveles bajos de E₂ para inhibir o retrasar la luteolisis, ya que el E₂ puede estimular la secreción de PGF_{2 α} , (Binelli *et al.*, 2001). En receptoras no superovuladas, al colocar un dispositivo P₄ el día 7 del ciclo implica la presencia de un foliculo dominante grande el día 15-17. En receptoras superovuladas, en muchas



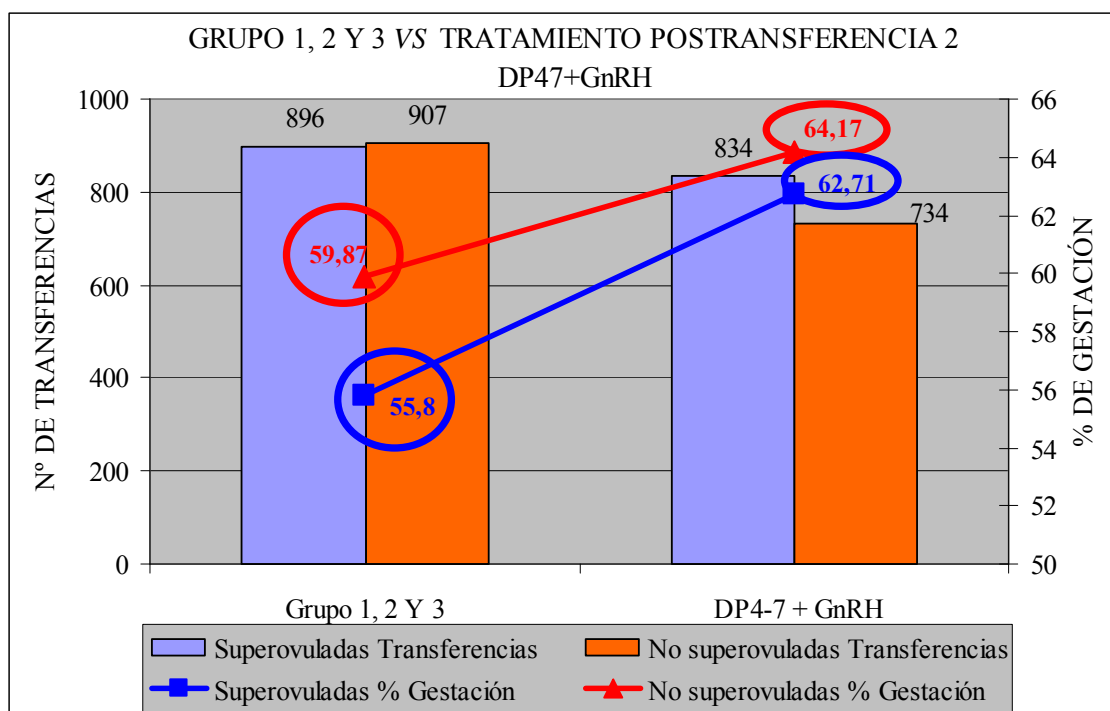
ocasiones se puede observar, en el día 7, más de un folículo en crecimiento que si le añadimos un dispositivo de P₄, podrían convertirse en folículos dominantes persistentes resultando en mayores niveles de E₂ en sangre que a su vez, podrían favorecer la síntesis de PGF_{2α}. Por este motivo nos planteamos aplicar el día de la transferencia, día 7, un dispositivo vaginal de P₄ junto con GnRH (5ml de Fertagyl[®]) y diez días más tarde, día 17 del ciclo, aplicamos otra GnRH (5ml de Fertagyl[®]); con la primera GnRH, día 7 del ciclo, provocamos la ovulación del folículo dominante, la formación de un CL accesorio y la aparición de una nueva onda de crecimiento folicular y con la segunda GnRH, provocamos la ovulación del nuevo folículo dominante, obtenemos un nuevo CL accesorio y conseguimos unos niveles bajos de E₂ en el período crítico del reconocimiento maternal de la gestación, lo que teóricamente favorecería mayores porcentajes de gestación.

En este tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇ + GNRH), tanto sin superovulación como con superovulación de receptoras, los resultados demuestran que la aplicación de un dispositivo vaginal de P₄ el día de la transferencia junto con el uso de dos GnRH, (una el día de la transferencia y otra 10 días después), aumentan los porcentajes de gestación de forma significativa (P=0,0248), en comparación con el grupo de tratamientos de sincronización (1, 2 y 3). La aplicación de la segunda GnRH (5ml de Fertagyl[®]), el día 17 es fundamental para provocar la ovulación del folículo dominante y disminuir así la concentración de E₂ en el período crítico del reconocimiento maternal de la gestación, para inhibir o retrasar la luteolisis (Binelli *et al.*, 2001).

Por todo ello, y a la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que el tratamiento de postransferencia 2 ensayado, se muestra como el tratamiento de elección para conseguir incrementar los porcentajes de gestación de las hembras receptoras de embriones de raza Frisona. Como hipótesis de trabajo para el futuro sería interesante comprobar cual sería el mejor día para inducir con 100μ de GnRH la ovulación del folículo dominante.



Gráfica 12: Porcentajes de gestación entre el grupo control 3 y el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇+GnRH).



Gráfica 13: Porcentajes totales de gestación entre receptoras superovuladas y no superovuladas, (grupos 1, 2 y 3) y el tratamiento postransferencia 2 (DP₄₋₇ + GNRH).

IV.2.3. Tratamiento postransferencia 3: FM7

Consiste en la aplicación i.m. de 500 mg de flunixin meglumine (Finadyne[®]) a la receptora, inmediatamente antes de la transferencia del embrión.

Este tratamiento postransferencia 3 se aplicó a 79 receptoras sincronizadas con el tratamiento del grupo 1 (B: prostaglandinas), con un 49,37% de gestaciones y 157 receptoras sincronizadas con el tratamiento con superovulación del grupo 3 (G: P₄ E₂+1.000 U.I. eCG), con un 54,14% de gestaciones. En total, 236 receptoras con un 52,54% de gestaciones (Tabla 35 Gráfica 14).

En nuestro estudio, no se han encontrado diferencias significativas entre el grupo 1 y 3 de sincronización de receptoras y el tratamiento postransferencia 3, para todas las variables estudiadas



Tabla 35: Tratamiento postransferencia 3: FM7 en receptoras no superovuladas y superovuladas.

GRUPO 1 y 3. Sin tratamiento postransferencia. Tratamiento de sincronización de receptoras sin y con superovulación					GRUPO 1 y 3 + Tratamiento postransferencia 3 FM7		
Tratamientos	Tipo Embrión	Transf n	Ges. n	% Ges.	Transf n	Ges. n	% Ges.
B= Prostaglandinas	ETG	121	63	52,07	79	39	49,37
G= P ₄ E ₂ + 1.000 U.I. eCG	FRES	149	87	58,39	59	36	61,02
	ETG	228	120	52,63	98	49	50,00
	Total	449	248	55,23	157	85	54,14
TOTALES		570	311	54,56	236	124	52,54

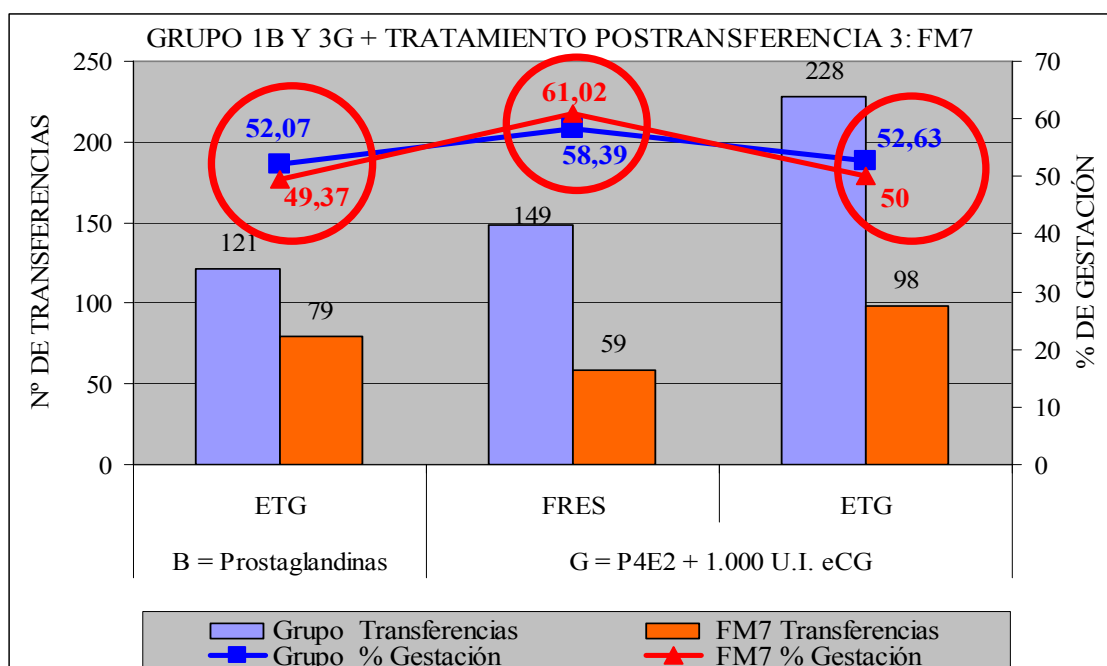
En bovinos, la manipulación del tracto reproductivo durante la transferencia embrionaria induce la liberación de PGF_{2α}, y una concentración elevada de esta hormona en sangre altera el establecimiento de la preñez ya que afecta al desarrollo embrionario, la calidad embrionaria, la capacidad del embrión para realizar su exclusión de la zona pelúcida e indirectamente, la funcionalidad del CL, aún ante la presencia de progesterona exógena (Buford *et al.*, 1996; Lemaster *et al.*, 1999; Elli *et al.*, 2001; Hockett *et al.*, 2004; Sales *et al.*, 2004).

El FM es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), cuya actividad biológica es la inhibición de la síntesis de PGF_{2α}; una sola dosis brinda efecto terapéutico durante 24 horas, basados en esta acción, nuestro estudio plantea su uso con objeto de aumentar los porcentajes de preñez en hembras receptoras de embriones. Sin embargo, diversos estudios realizados con FM han arrojado resultados variables en los porcentajes de preñez en la transferencia embrionaria, en este sentido, Schrick *et al.* (1999), sugiere que la PGF_{2α} producida por la manipulación del útero durante la transferencia de embriones puede afectar negativamente a la supervivencia del embrión, este autor califica la dificultad de la transferencia en tres categorías 1: leve manipulación; 2: moderada manipulación y 3: mucha manipulación. Obtiene diferencias muy significativas en los porcentajes de gestación entre la leve manipulación y los otros dos grupos (P<0,001). Este mismo autor en estudios posteriores del año 2000, obtiene mayores porcentajes de gestación en las receptoras que recibieron una inyección de 10 ml de Finadyne® (500 mg de FM), frente a las que no lo recibieron, y en este sentido, sus resultados no coinciden con los hallados por nosotros en el presente estudio, al no haber encontrado diferencias significativas.

Sin embargo, al igual que en el presente trabajo experimental, McNaughtan (2004), no obtienen diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre el grupo control y el grupo tratado con FM cuando se transfiere embriones congelados a receptoras mestizas Hereford x Angus con un CL bueno, con buena condición corporal y un buen desarrollo del aparato reproductor: 45% de gestaciones para el grupo control frente al grupo experimental con 50% de gestaciones que recibe 10 ml de Finadyne®, (500 mg de FM), inmediatamente antes de la transferencia.



Por otra parte Scenna *et al* (2005), realiza un experimento con vacas para valorar la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por el endometrio debido a la manipulación del útero durante la transferencia; hace un análisis de sangre, antes y después de las transferencias; los perfiles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ indican que la manipulación del tracto reproductivo durante la transferencia induce un incremento en la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por el endometrio. Las receptoras se dividieron en dos grupos, uno recibió 500 mg de FM en el momento de la transferencia y el otro grupo no fue tratado. Entre el grupo tratado con FM y el grupo control se obtuvieron diferencias significativas para los porcentajes globales de gestación, ($P < 0,02$); para los porcentajes de gestación de mórulas y blastocistos ($P < 0,06$ y $P < 0,04$, respectivamente), y para los porcentajes de gestación de los embriones calidad 2 entre el grupo FM y el grupo control ($P < 0,01$). Sin embargo, al igual que nosotros, no obtuvo diferencias significativas para los embriones calidad 1, entre el grupo FM y el grupo control. En nuestro estudio todos los embriones transferidos son calidad 1 y las transferencias son no quirúrgicas; no hemos encontrado diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con 500 mg de FM (Finadyne[®]), lo que confirma los resultados obtenidos por Scenna (2005), para ese grupo de embriones.



Gráfica 14: Porcentajes de gestación entre el tratamiento postransferencia 3 y el tratamiento de sincronización de receptoras del grupo 1 B (Prostaglandinas) y el tratamiento de sincronización de receptoras del grupo 3, con superovulación G ($\text{P}_4\text{E}_2 + 1.000$ U.I. eCG) en función del tipo de embrión.

Sería interesante comprobar a la vista de nuestros resultados obtenidos, si la aplicación de un antiluteolítico de más larga duración en el momento de la transferencia puede ser efectivo, solo o acompañado de la aplicación del tratamiento postransferencia 2, del presente estudio.

Sin embargo, debemos tener en cuenta que existen multitud de variables que vienen a determinar el porcentaje de gestación alcanzado por la receptora en un programa de TE en el ganado bovino y ser conscientes de que los eventos que están involucrados en el reconocimiento maternal de la gestación son muy complejos y no parecen fácilmente



influenciables por sustancias antiluteolíticas aplicadas de modo puntual; mayores estudios pueden ser necesarios para establecer una relación inequívoca causa-efecto.

Finalmente, tratados en **conjunto los tres grupos postransferencia**, mediante el análisis GLM y comparación de medias de mínimos cuadrados se ha encontrado que:

1. Existen diferencias significativas en los porcentajes de gestación, entre el grupo postransferencia 2 (DP₄₋₇+GnRH) (63,39%) y el grupo postransferencia 1 (DP₄₋₇), (56,16%), P=0,0008.
2. Existen diferencias significativas en los porcentajes de gestación, entre el grupo postransferencia 2 (DP₄₋₇+GnRH) (63,39%) y el grupo postransferencia 3 FM7, (52,54%), P=0,0046.
3. Existen diferencias significativas en el tipo de embrión, entre los transferidos en FRE, (n= 429/662) (64,8%) y los congelados en ETG, (n= 839/1458) (57,54%), (P=0,0017).
4. No se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de sincronización de receptoras; ni entre el grupo de receptoras superovuladas y no superovuladas, ni en el estado de desarrollo de los embriones.

Analizando estos resultados, observamos una vez más que el mayor porcentaje de gestación en los grupos de tratamiento postransferencia lo alcanzamos con el tratamiento 2, con diferencias muy significativas respecto a los tratamientos postransferencia 1 y 3. La aplicación de un dispositivo de P₄ y GnRH el día de la transferencia y una segunda inyección de GnRH 10 días más tarde, mejora muy significativamente los porcentajes de gestación de las receptoras, probablemente debido a lo señalado anteriormente en este trabajo experimental cuando afirmamos que con la segunda aplicación de GnRH el día 17 (día 0: día del celo), conseguimos la ovulación del folículo dominante, disminuyendo así la concentración de E₂, inhibiendo o retrasando la luteolisis, ya que niveles altos de E₂, pueden estimular la secreción de PGF_{2α} en el periodo crítico del reconocimiento maternal de la gestación, (Binelli *et al.*, 2001).

V.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De acuerdo con las condiciones descritas y el diseño experimental realizado en la presente Tesis Doctoral, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, así como la discusión de los mismos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1.- Los tratamientos de sincronización de receptoras sin control de la onda folicular y sin superovulación (grupo 1), y los que controlan la onda folicular y la ovulación, pero sin superovulación (grupo 2), tienen un porcentaje de gestación superior con significación estadística, respecto a los tratamientos con superovulación del grupo 3. No obstante, los buenos porcentajes de gestación obtenidos, sea cual sea el tratamiento de sincronización aplicado, nos hace decantarnos por los tratamientos que controlan farmacológicamente la onda folicular y la ovulación, (con o sin superovulación), ya que nos permite la TETF, lo cual es una gran ventaja al poder programar las transferencias sin la necesidad de la detección de celos.

2.- Con los embriones frescos, se obtiene un porcentaje de gestación en las receptoras superior al obtenido con los congelados, sin embargo, los porcentajes de gestación conseguidos con los embriones congelados son lo suficientemente buenos (ya sea con GLI o con ETG), como para considerar la crioconservación de embriones como una técnica crucial en el trasplante de embriones de la especie bovina, y particularmente ventajosa se revela la congelación de embriones en ETG, pues ofrece la posibilidad de su TD posdescongelación, sin necesidad de retirar el crioprotector.

3.- Los blastocistos expandidos congelados tienen significativamente peores porcentajes de gestación que mórulas compactas, jóvenes blastocistos y blastocistos; pero sin embargo, en fresco, se comportan igual o incluso presentan los mejores resultados de gestación con respecto a los otros estados embrionarios. Este hecho nos hace pensar, que la congelabilidad de los blastocistos expandidos es peor por su mayor complejidad celular y estructural, por ello, es aconsejable transferirlos en fresco siempre que sea posible.

4.- En cuanto a la calidad del CL, las receptoras con CL de calidad buena o regular tienen significativamente mayores porcentajes de gestación que las receptoras con CL malos, resultando determinante en los porcentajes de gestación.

5.- La utilización de P₄ y GnRH como tratamiento de postransferencia en receptoras, (tratamiento postransferencia 2), mejora, con significación estadística, los porcentajes de gestación con respecto a los totales obtenidos sin tratamiento postransferencia; también mejora los porcentajes de gestación conseguidos con el uso de tratamientos posimplantación con P₄ sola o con inhibidores de la PGF_{2α}. Introducir el uso de GnRH en el tratamiento de postransferencia con P₄ puede ejercer su efecto beneficioso al provocar la bajada de los niveles de estrógenos, inhibiendo o retrasando la luteolisis, en el periodo crítico del RMG, facilitando de este modo la gestación.

VI.- RESUMEN



RESUMEN

La técnica biotecnológica del trasplante de embriones se puede ver afectada por una serie de variables inherentes a la donante (raza, edad, estado nutricional, estado sanitario, estado fisiológico, tratamiento de superovulación); al embrión (calidad, tipo de embrión, estado de desarrollo); a la aplicación de la propia técnica y a las receptoras, (raza, edad, estado nutricional, estado sanitario, estado fisiológico, tratamientos de sincronización empleado, sincronismo donante-receptora). La gran cantidad de factores que afectan el éxito de la TE, explican la variabilidad de los resultados obtenidos.

Teniendo en cuenta a las receptoras, este trabajo se ha llevado a cabo en novillas bovinas de raza Frisona que han recibido un embrión de calidad 1, con el fin de evaluar el porcentaje de gestación obtenido según los diferentes protocolos de sincronización utilizados, el tipo de embrión, el estado de desarrollo del embrión transferido y la calidad del CL que presentaban. También se han ensayado tres tratamientos postransferencia con el propósito de mejorar los resultados de gestación de estas hembras.

Este estudio se ha realizado en 193 explotaciones de ganado vacuno de producción láctea en España. Se han transferidos 4.898 embriones, calidad 1 (excelentes), previa a la congelación o a la transferencia en fresco. Todas las receptoras utilizadas han sido novillas Frisonas entre 14 y 17 meses, con una correcta condición corporal, correcto estado sanitario, y estado reproductivo sin problemas patológicos.

En el experimento 1 se han utilizado 2.250 transferencias. Los tratamientos de sincronización aplicados han sido: el grupo 1 (n=1.202), tratamientos sin control farmacológico de la onda folicular emergente y sin superovulación, (prostaglandinas y celos naturales); el Grupo 2 (n=152), tratamientos con control farmacológico de la onda folicular emergente del celo, la ovulación y sin superovulación: PRID[®] completo con la cápsula de estrógenos y un tratamiento similar al PRID[®] completo pero sin estrógenos y con GnRH a las 48 horas de retirada del dispositivo, (P4-12+GnRH). El Grupo 3 (n=896), tratamientos con control farmacológico de la onda folicular emergente del celo y la ovulación, y con superovulación, (tres tratamientos con diferentes hormonas y diferentes dosis para inducir la superovulación de las receptoras). Se han valorado los porcentajes de gestación obtenidos según el tratamiento de sincronización, el tipo de embrión (frescos o congelados en glicerol o etilenglicol), el estado de desarrollo del embrión y el cuerpo lúteo.

En el experimento 2 (n=2.648), se han ensayado tres tratamientos postransferencias para intentar mejorar el porcentaje de gestación obtenido en las receptoras. El tratamiento postransferencia 1 (n=844), consiste en la colocación de un dispositivo intravaginal de progesterona el día de la transferencia y se retira 12 días más tarde. En el tratamiento 2 (n=1.568), se coloca un dispositivo intravaginal de progesterona el día de la transferencia, (día 7 poscelo), junto con una GnRH; 10 días más tarde, se aplica otra GnRH y el día 12 postransferencia se retira el dispositivo de progesterona. El tratamiento 3 (n=236), consiste en la aplicación de 500 mg de flunixin meglumine, (10 ml de Finadyne[®]), justo antes de la transferencia.

Cuando comparamos cada uno de los tratamientos utilizados en la sincronización de receptoras entre sí dentro de los grupos de tratamiento de sincronización de receptoras



(1, 2 y 3), los análisis realizados muestran diferencias significativas entre los porcentajes de gestación de los tratamientos del grupo 1 (prostaglandinas y celos naturales), (59,40%) con los tratamientos del grupo 3 (tratamiento de sincronización de receptoras con control farmacológico de la onda folicular y con superovulación), (55,80%) ($P=0,0135$), también entre el tratamiento de sincronización B (prostaglandinas) del grupo 1 y el tratamiento de sincronización, G (P_4E_2 1.000 U.I. eCG) del grupo 3, (60,40% vs. 55,23% respectivamente) ($P=0,0099$), y entre el tratamiento de sincronización B (prostaglandinas) del grupo 1 y el tratamiento de sincronización I (P_4E_2 325 U.I. Pluset[®] FSH/LH), del grupo 3, (60,40% vs. 56,88% respectivamente) ($P=0,0238$).

Sin embargo cualquiera de los grupos estudiados muestran porcentajes de gestación más que aceptables, lo que hace que aconsejemos el uso de los protocolos de sincronización que controlan la dinámica folicular y la ovulación (con o sin superovulación), pues nos ofrecen la ventaja de poder programar los tratamientos de sincronización, sin necesidad de detectar celos y consiguen porcentajes mayores de aprovechamiento de receptoras, y además, tenemos más hembras gestantes, puesto que estos tratamientos han aumentado el número de receptoras tratadas que recibieron un embrión en protocolos de TETF. Particularmente ventajosos se muestran los tratamientos que controlan la dinámica folicular y la ovulación con superovulación (grupo 3), sobre todo cuando se utilizan grupos grandes de receptoras, donde se facilita mucho la selección de receptoras para la transferencia.

Los resultados del análisis estadístico con respecto al tipo de embrión, muestra que existen diferencias altamente significativas entre los embriones transferidos FRE, que presentan los mejores porcentajes de gestación, con respecto a los congelados en ETG, (62,26% vs. 52,97%, respectivamente) ($P=0,0007$) y diferencias significativas entre los congelados en GLI y congelados en ETG, (59,12% vs. 52,97%, respectivamente) ($P=0,0359$). Sin embargo en nuestro estudio, no se han encontrado diferencias significativas entre FRE (62,26%) y congelados en GLI (59,12%). Los resultados obtenidos con embriones congelados son suficientemente buenos como para poder afirmar que la criopreservación de embriones bovinos presenta ventajas de movilidad espacio temporal sobre las ofrecidas por embriones en fresco en la técnica del TE.

En el análisis estadístico global de los grupos 1, 2 y 3 de tratamientos de sincronización de receptoras con respecto al estado de desarrollo del embrión transferido, hubo diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre mórulas compactas y blastocistos expandidos, (59,60% vs. 42,41%, respectivamente) ($P<0,0001$); entre jóvenes blastocistos y blastocistos expandidos, (57,73% vs. 42,41%, respectivamente) ($P=0,0002$), y entre blastocistos y blastocistos expandidos, (61,22% vs. 42,41%, respectivamente) ($P<0,0001$). Sin embargo, cuando las mórulas compactas, jóvenes blastocistos, blastocistos, y blastocistos expandidos se transfieren en fresco, no existen diferencias significativas entre los porcentajes de gestación de los distintos estadios e incluso los blastocistos expandidos, presentan los más altos porcentajes de gestación. De estos resultados podemos deducir que los blastocistos expandidos al ser embriones más diferenciados, más avanzados en su desarrollo, si se someten al proceso de congelación, el crioprotector no sea capaz de alcanzar toda su compleja estructura por lo que no le proporciona una buena protección y provoca un descenso dramático de su porcentaje de gestación, si lo transferimos después de haber sido sometido al proceso de congelación.



Respecto a la calidad del CL, existen diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre los CL calidad 1 y calidad 3 (64,71% vs. 46,01%, respectivamente) ($P < 0,0001$), y entre los CL calidad 2 y calidad 3 (63,43% vs. 46,01%, respectivamente) ($P < 0,0001$); pero no entre los CL calidad 1 y calidad 2 (64,71% vs. 63,43%, respectivamente). Cuerpos lúteos de buena calidad, en el momento de la transferencia, se relacionan con mayores porcentajes de gestación en receptoras de embriones.

Finalmente el tratamiento postransferencia 2, (DP₄₋₇+GnRH), es el tratamiento con el que se obtienen porcentajes de gestación significativamente mejores en nuestro estudio, tanto frente a los tratamientos de sincronización del experimento 1 como frente a los otros dos tratamientos postransferencia, por lo que su uso es aconsejable como método para mejorar los porcentajes de gestación de novillas receptoras de embriones de raza Frisona en programas comerciales de TE.

VII.- SUMMARY.



SUMMARY

This biotechnological technique can be affected by a number of inherent donor variables (race, age, nutritional status, health status, physiological state, superovulation treatment); the embryo (quality, type of embryo, development stage); the application of the technique itself and recipients, (race, age, nutritional status, health status, physiological state, synchronization treatment used, synchronization donor-recipient). This large number of factors affecting the success of the TE explain the variability of the results.

Given the recipients, this work was projected in bovine Friesian heifers that received a grade 1 embryo in order to evaluate the pregnancy rate obtained for different synchronization protocols used, the type of embryo, transferred embryo development and quality of CL presented. They have also been tested three treatments post transfer in order to improve pregnancy outcomes of these females.

This study was conducted on 193 cattle dairy farms in Spain. 4,898 embryos were transferred, all grade 1 (excellent), prior to freezing or fresh transfer. All receiving Friesian heifers used were between 14 and 17 months, with a proper body condition, correct health status, and reproductive status without pathological problems.

In Experiment 1, 2,250 transfers have been used synchronization treatments applied were: group 1 (n = 1,202), without drug treatment emergent control of follicular wave without superovulation (prostaglandins and natural heats); Group 2 (n = 152), treatments with pharmacological control of follicular wave emerging estrus, ovulation without superovulation: PRID® capsule complete with estrogen and a similar treatment to full PRID® without estrogen and GnRH 48 hours after removal of the device, (P4-12 + GnRH). Group 3 (n = 896), treatments with pharmacological control of follicular wave emerging estrus and ovulation and superovulation (three treatments with different doses and different hormones to induce superovulation of recipients). We have evaluated the pregnancy rates obtained by the synchronization treatments, the type of embryo (fresh or frozen in glycerol or ethylene glycol), the state of development of the embryo and the corpus luteum.

In experiment 2 (n = 2,648), were tested three posttransfer treatments to try to improve the pregnancy rate obtained in receiving treatments. Treatment 1 post transfer (n = 844), involves the placement of a progesterone intravaginal device on transfer and removed 12 days later. In treatment 2 (n = 1,568), an intravaginal progesterone device the day of transfer, (7th postheat) is placed, along with a GnRH; 10 days later, another GnRH and day 12 post transfer device is removed progesterone applies. Treatment 3 (n = 236), involves the application of 500 mg of flunixin meglumine (10 ml Finadyne®) just before transfer.

When comparing each of the treatments used for synchronization of recipients to each other within the treatment groups receiving synchronization (1, 2 and 3), the analyzes show significant difference between pregnancy rates of treatment group 1 (prostaglandins and natural heat), (59.40%) with treatment group 3 (treatment with receiving synchronization pharmacological control of follicular wave and superovulation), (55.80%) (P = 0.0135) also synchronization between treatment B (prostaglandins) in group 1 and treatment timing, G (P4E2 1,000 IU eCG) Group 3,



(60.40% vs. 55.23%, respectively) ($P = 0.0099$), and synchronization between treatment B (prostaglandins) in group 1 and treatment synchronization I (325 IU Pluset[®] P₄E₂ FSH / LH), group 3 (60.40% vs. 56.88%, respectively) ($P = 0.0238$).

However any of the groups studied show more than acceptable percentage of gestation, which makes us advise using synchronization protocols that control follicular dynamics and ovulation (with or without superovulation), because they offer the advantage of being able to program synchronization treatments without heat detection and achieve higher utilization rates of recipients, and also get more pregnant females, since these treatments have increased the number of recipients who received an embryo treated in TETF protocols. Particularly advantageous treatments that control follicular dynamics and ovulation with superovulation (group 3), specially when large groups of recipients, which is much easier to select recipients for the transfer is used.

The statistical analysis results for the type of embryo shows that highly significant differences exist between the transferred embryos FRE, which present the best pregnancy rates with respect to frozen ETG, (62.26% vs. 52.97 %, respectively) ($P = 0.0007$) and significant differences between the frozen and frozen GLI ETG (59.12% vs. 52.97%, respectively) ($P = 0.0359$). However, in our study, there have been no significant differences between FRE (62.26%) and frozen in GLI (59.12%). The results obtained with frozen embryos are good enough to say that the bovine embryo cryopreservation has advantages of mobility temporary space on offer fresh embryos in the TE technique.

In the comprehensive statistical analysis of the groups 1, 2 and 3 receiving treatments synchronization regarding the status of development of the embryo transferred, there were significant differences in pregnancy rates between compacted morulae and blastocysts expanded (59.60% vs . 42.41%, respectively) ($P < 0.0001$); among young blastocysts and expanded blastocysts (57.73% vs. 42.41%, respectively) ($P = 0.0002$), and between blastocysts and expanded blastocysts (61.22% vs. 42.41%, respectively) ($P < 0.0001$). However, when the compact morulae, blastocysts young, blastocysts and expanded blastocysts were transferred into fresh, no significant differences between the percentages of the different stages of pregnancy and even expanded blastocysts have the highest pregnancy rates. From these results we can deduce that the expanded blastocysts to be more differentiated embryos, more advanced in their development, if subjected to the freezing process, the cryoprotectant not be able to achieve all its complex structure which does not provide good protection and It causes a dramatic decrease in their pregnancy rate if transferred after being subjected to the freezing process.

Regarding the quality of the CL, there are significant differences in pregnancy rates between 1 and CL-quality quality 3, (64.71% vs. 46.01%, respectively) ($P < 0.0001$), and between CL grade 2 and grade 3 (63.43% vs. 46.01%, respectively) ($P < 0.0001$); but not between quality CL 1 and quality 2, (64.71% vs. 63.43%, respectively). Corpora lutea of good quality, at the time of the transfer, are associated with higher pregnancy rates in embryo recipients.

Finally, post-transfer treatment 2 (DP4-7 + GnRH), is the treatment that significantly better pregnancy rates are obtained in our study, both to treatments synchronization of Experiment 1 as compared to the other two treatments post-transfer treatment , so their



use is recommended as a method to improve pregnancy rates of recipient heifers Friesian embryos in TE commercial programs.

VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.



BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G.** (1994). Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology*, 41: 19-24.
- Adams, G.; Pierson R.** (1995). Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology*, 43: 113-120.
- Adams, G.; Matteri R.; Kastelic J.; Ko J.; Ginther O.** (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94: 177-188.
- Adams, G. P.; Nasser, L. F.; Bo, G. A.; Mapletoft, R. J.; García, A.; Del Campo, M. R.** (1994). Superstimulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus 2 in heifers. *Theriogenology*, 42: 1103-1113.
- Adams, G.; Jaiswal, R.; Singh, J.; Malhi, P.** (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69: 72-80.
- AETE.** (2015). *31st Annual Meeting A.E.T.E. – Ghent, Belgium, 11th – 12th September 2015.* 9-17.
- AETE.** (1984-2014). *Proceedings Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association.* 1984-2014.
- Agca, Y.; Monson, R. L.; Northey, D. L.; Abas Mazni, O.; and Rutledge, J. J.** (1994). Post-thaw survival and pregnancy rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification. *Theriogenology*, 41: 154.
- Agca, Y.; Monson, R. L.; Northey, D. L.; Abas Mazni, O.; Schaefer, D. M.; and Rutledge, J. J.** (1998). Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, 50: 147-162.
- Aguilar, M.; Gallina, C.** (2002). Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod. Dom. Animal.*, 237: 1-6.
- Ake Lopez, J. R.; Alfaro Gamboa, M. E.; Holy, L.** (1994). 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. *Vet. Mex* 26: 189-193.
- Al-Katanani, Y. M.; Drost, M.; Monson, R. L.; Rutledge, J. J.; Krininger III, C. E.; Blockb, J.; Thatcher W.W.; Hansena, P.J.;** (2002a). Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 2002, 58: 171-182.
- Al-Katanani, Y.M.; Paula-Lopes, F. F.; Hansen, P.J.;** (2002b). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci.*, 2002, 85: 390-396.
- Allrich, R. D.** (1993). Estrous behaviour and detection in cattle. *Vet Clinics N. America: Food Anim. Practice*, 9: 249-262.
- Almeida, A. P.** (1989). Nonsurgical embryo transfer in cattle: The effect of clenbuterol on pregnancy rates. *Theriogenology*, 31: 166.



- Ambrose, J. D.; Drost, M.; Monson, R. L.; Rutledge, J.J.; Leibfried-Rutledge, M. L.; Thatcher, M. J.;** (1999). Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen *in vitro* produced embryos to increase pregnancy rates in heat stressed dairy cattle. *J Dairy Sci.*, 82: 2369-2376.
- Arreseigor, C. J.; Sisul, A.; Arreseigor, A. E.; And Stahringer, R. C.** (1998). Effect of cryoprotectant, thawing method, embryo grade and breed on pregnancy rates of cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology*, 49: 160.
- Barati, F.; Niasari-Naslaji, A.; Bolourchi, M.; Razavi, K.; Naghzali, E.; Sarhaddi, F.** (2007). Pregnancy rates of frozen embryos recovered during winter and summer in Sistani cows. *Iranian J Vet. Res.*, 8: 151-154.
- Barceló-Fimbres, M.; Brink, Z.; Seidel, G. E. Jr.** (2009). Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. *Theriogenology*, 71: 355-368.
- Barret, J.** (1992). Finding the sources of top genetics. *Holstein World*: 37: 18-27.
- Barreto, A.; and MacManus, C.** (2002). The effect of progestagen CIDR device on pregnancy rates in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*, 57: 1974-1989.
- Baruselli, P. S.; Marques, M. O.; Carvalho, N. A. T.; Valentim, R.; Berber, R. C. A.; Carvalho Filho, A. F.; Madureira, E. H.; Costa Neto, W. P.** (2000a). Ovsynch protocol with fixed-time embryo transfer increasing pregnancy rates in bovine recipients. *Arq Fac Vet UFRGS*, 28: 205.
- Baruselli, P. S.; Marques, M. O.; Carvalho, N. A. T.; Valentim, R.; Berber, R. C. A.; Carvalho Filho, A. F.; Madureira, E. H.; Costa Neto, W. P.** (2000b). Aumento da taxa de penhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo ovsynch com inováção em tempo fixo. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 28: 216.
- Baruselli, P. S.; Marques, M. O.; Madureira, E. H.; Bó, G. A.; Costa Neto, W. P.; Grandinetti, R. R.** (2000c). Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. *Arq.Fac. Vet UFRGS*, 28: 218.
- Baruselli, P. S.; Marques, M. O.; Hoffmann E. M.; Costa Neto, W. P.; Grandinetti, R. R.; Bó, G. A.** (2001). Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. *Theriogenology*. 55: 157.
- Baruselli, P. S.; Marques, M. O.; Nasser, L. F; Reis, E. L.; and Bó, G. A.** (2003a) Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR–B devices for timed artificial insemination. *Theriogenology*. 59: 214.
- Baruselli, P. S.; Marques, M. O.; Reis, E.; Nasser, L. F.; Silva, R.; Menegatti, J.; Valentin, R.; Santos, I.** (2003b). Adequação da dose de FSH (Follitropin-V) em protocolos de superovulacao das vacas Nelore, com inseminacao artificial em tempo fixo. *Memorias, XVII Reunion Anual de la Sociedad Brasileira de Tecnología de Embriones*. Brasil.
- Baruselli, P. S.; Bó, G. A.; Reis, E. L.; Marques, M. O.; de Sá Filho, M.** (2005a). Introducción de la IATF en el manejo reproductivo de rebaños de Ganado de engorde en Brasil. *Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina*. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia, 121-137.



- Baruselli, P.S.; de Sá Filho, M.; Martins, C.; Reis, E.; Nasser, L., Bó, G.** (2005b). Nuevos avances en los tratamiento de súperovulación en donantes de embriones. *Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina*. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia, 139-154.
- Baruselli P.S.; de Sá Fhilo M.; Matins, C. M.; Nasser, L. F.; Nogueira, M. F. G.; Barros, C. M.; Bó, G. A.** (2006). Superovulation and embryo transfer in Bos Indicus cattle. *Theriogenology*, 65: 77-88.
- Baruselli, P.S.; Gimenes, L. U.; Sales, J. N. S.** (2007). Fisiologia reproductiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.2: 205-211.
- Baruselli, P.S.; Sales, J. N. S.; Crepaldi, G. A.; Sá Filho, M. F.** (2009). Uso de la ecg en biotecnologías reproductivas en bovinos. *VIII Simposio Internacional De Reproduccion Animal-Irac*, 1-26.
- Baruselli P.S.; Ferreira, R. M.; Fhilo, M. F.; Nasser, L. F.; Rodrigues, C. A.; and Bó. G. A.** (2010). Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical enviroments. *Reproduction Fertility and Development*, 22: 67-74.
- Baruselli, P.S.; Ferreira, R. M.; Sales, J. N. S.; Gimenes, L. U.; Sá Filho, M. F.; Martins, C. M.; Rodrigues, C. A.; Bó, G. A.** (2011). Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 76: 1583-1593.
- Bauersachs, S.; Ulbrich, S. E.; Reichenbach, H. D.; Reichenbach, M; Buttner, M.; Meyer, H. H.; Spencer, T. E.; Minten, M; Sax, G.; Winter, G.; Wolf, E.** (2012). Comparison of the effects of early pregnancy with human interferon, alpha 2 (IFNA2), on gene expression in bovine endometrium. *Biol Reprod.*, 86: 46.
- Baxter, S.; Ward, W.** (1997). "Incidence of fetal loss in dairy cattle after pregnancy diagnosis using an ultrasound scanner". *Veterinary Record* 140: 287-288.
- Beal, W. E.** (1999). Streamlining Embryo Transfer. 1999. *Proceedings of the 18th Annual Convention. American embryo Transfer Association.* 78-85.
- Beal, W. E.; and Hinshaw, R. H.** (2000). Synchronization of estrus and ovulation in bovine embryo transfer recipients *Virginia Polytechnic Institute and State University and Ashby Embryos Inc.*AABP.
- Beal, W. E.; Hinshaw, R. H.; and Whitman, S. S.** (1998). Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer. *Theriogenology*, 49:241.
- Beltman, M. E.; Lonergan, P; Diskin, M.G.; Roche, J. F.; Crowe, M. A.** (2009). Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology*, 71: 1173-1179.
- Bergfelt, D.; Lightfoot, K.; Adams, G.** (1994). Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, 42: 895-907.



- Betteridge, K.J.; Eaglesome, M.D.; Randall, G.C.; Mitchell, D.** (1980). Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus. *J. Reprod Fertil*, 59: 205-216.
- Bilby, T.R.; Guzeloglu, A.; Kamimura, S.; Pancarci, S. M.; Michel, F.; and Head, H. H.** (2004). Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows. I. Ovarian, conceptus, and insulin – like growth factor system responses. *J. Dairy Sci.*, 87, 32: 56-67.
- Binelli, M.; Thatcher, W.; Mattos, R.; Baruselli, P.** (2001). Antiluteolytic Strategies to Improve Fertility in Cattle. *Theriogenology* 2001. 56: 1451-1463.
- Block, J.; and Hansen P. J.** (2007). Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology*, 67: 1518-1529.
- Block, J.; Drost, M.; Monson, R. L.; Rutledge, J. J.; Rivera, R. M.; Paula-Lopez, F. F.; Ocon, O. M.; Krininger III, C. E.; Liu, J.; Hansen, P. J.** (2003). Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *J Anim Sci* 2003;81:1590-1602.
- Block, J; Bonilla L.; Hansen P. J.** (2009). Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology* 71: 1063-1071.
- Block, J; Bonilla L.; Hansen P. J.** (2010). Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J Dairy Sci.*, 93: 5234-5242.
- Bó, G. A.;** (2000). Manipulación de la Dinámica folicular en Ganado bovino: Su Aplicación en Programas de Transferencia de embriones”. *II Simposio internacional de Reproducción animal*. Argentina.
- Bó, G. A.;** (2003) Sincronización de celos para programas de Inseminación Artificial y Transferencia de embriones Bovinos. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba Argentina (IRAC).
- Bó, G. A.; & Caccia, M.** (2003). Ultrasonografía reproductiva en el ganado bovino. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Católica de Córdoba Argentina. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (IRAC).
- Bó, G. A.; & Mapletoft, R.; J.** (2003). Superovulación en Bovinos. En: *Reproducción en los animales domésticos*, Tomo II. R. Ungerfeld. Montevideo, Uruguay. 515-538
- Bó, G. A.; Martinez, M.; Nasser, L.; Caccia, M.; Tribulo, H.; Mapletoft, R. J.** (1993). Follicular dynamics in *Bos indicus* and *Bos taurus* beef cattle under pasture conditions in Argentina. *Proc 10th Congreso Brasileiro de Reproducao Animal* , 2: 221.
- Bó, G. A.; Hockley, D. K.; Nasser, L. F.; Mapletoft, R. J.** (1994). superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology* 42: 963-975.



- Bó, G. A.; Adams, G.P; Caccia M.; Martinez, M.; Pierson, R. A.; Mapletoft, R. J.** (1995a). Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, 39: 193-204.
- Bó, G. A.; Adams, G. P.; Pierson, R. A.; Mapletoft, R. J.** (1995b). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43: 31-40.
- Bó, G., Berfegfet, D.; Brogliatti, G.; Pierson, R.; and Mapletoft, R.** (1996a). Sistemic Vs. local effect of exogenous estradiol on follicular development in heifers. *Theriogenology*, 45, 1: 333.
- Bó, G. A.; Adams G. P.; Pierson R. A.; Mapletoft R. J.** (1996b). Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 45: 897-910.
- Bó, G. A.; Berfegfet, D.; y Mapletoft, R.** (1996c). Manipulación de la dinámica folicular en ganado bovino: Su aplicación en programas de Transferencia de embriones. Memorias, *II Simposio internacional de reproducción animal*. Cordoba, Argentina, 53-68.
- 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*, 207.
- Bó, G. A.; Baruselli P. S.; Moreno D.; Cutaia L.; Caccia M.; Tríbulo H.; Mapletoft R. J.;** (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57: 53-72.
- Bó, G. A.; Moreno, D.; Cuaita, L.; Caccia, M.** (2003a). Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones. *Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva*. Bogotá, Colombia, 102-119.
- Bó, G. A.; Baruselli P.; Martinez M.** (2003b). Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 78: 307-326.
- Bó, G. A.; Moreno, D.; Cutaia, L.; Caccia, M.** (2004a). Transferencia de embriones a tiempo fijo: Tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus – Año 4*, 21: 25-45.
- Bó G.A., Moreno, D.; Cutaia L.; Baruselli P. S.; & Reis, E. L.** (2004b). Hormonal manipulation of the estrous cycle in bovine embryo donors and recipients. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32 (Suppl): 1-22
- Bó, G. A.; Moreno, D.; Cutaia, L.; Caccia, M.; Tríbulo, R. J.; Tríbulo, H. E.** (2006). Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Educación Continua. UNCPBA*.
- Bó, G. A.; Cutaia, L.; E.; Souza, A. H.; y Baruselli, P. S.** (2009). Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche utilizando dispositivos con progesterona *Taurus*, Bs. As., 11, 41: 20-34.
- Bó, G. A.; Daniel, A. E.; Carballo Guerrero A. B.; Tríbulo, A.; Tríbulo, H.; Tríbulo, R.; Rogan, D.; Mapletoft, R. J.** (2010). New approaches to superovulación in the cow. *Reproduction, Fertility and Development*. 22: 106-112.



- Bó, G. A.; Coelho, Peres Lucas; Cutaia, Lucas E.; Pincinato, Danilo; Baruselli, Pietro S.; Mapletoft R. J.:** (2012a). Treatments for the synchronization of bovine recipients for fixedtime embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reproduction, Fertility and Development*, 24: 272-277.
- Bó, G. A.; Baruselli P. S.; Mapletoft R. J.** (2012b). Increasing pregnancies following synchronization of bovine recipients. *Anim Reprod.*, 9, 3: 312-317.
- Bó, G. A.; Peres, L. C.; Danilo Pincinato; Baruselli, P. S.; Mapletoft, R. J.** (2013). Programa de Sincronización de receptoras de embriones bovinos. *X Simposio Internacional de Reproduccion Animal – IRAC*.
- 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.
- Bondioli, K.** (2015). Cryopreservation of bovine embryos. **In:** *Bovine Reproduction, Chap 77* First Edition. Edited by Richard M. Hopper. © 2015 John Wiley & Sons, Inc. Published 2015 by John Wiley & Sons, Inc.
- Bondoc, O. L.; Smith, C.; Gibson, J. P.** (1989). A review of breeding strategies for genetic improvement of dairy cattle in developin countries. *Animal Breed* 57: 819-829.
- Bousfield, G.R.; Butnev, V. Y.** (2001). Identificación de twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin beta and equine luteinizing hormone ss by solid-phase Edman degradation. *Biol Reprod* 2001, 64: 136-147.
- Bowen, J.M., Elsdén, R.P. and Sidel, G.E., Jr.** (1978). Non surgical embryo transfer in cow. *Theriogenology*, 10: 89-96.
- Breuel, K. F.; Baker, R. D.; Butcher, R .L.; Townsend, E. C.; Inskeep, 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.
- Bridges, P.; Wright, D.; Buford, W.; Ahmad, N.; Hernandez, H.; McCormick, M.; Schrick, F.; Dailey, R.; Lewis, P.; Inskeep, E.** (2000). Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *Journal of American Science*. 78, 11: 2942-2949.
- Broadbent, P. J.; Stewart, M.; and Dolman, D. F.** (1991). Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* 35. 1: 125-139.
- Buford, W. I.; Ahmad, N.; Schrick, F. N.; Butcher, R. L.; Lewis, P. E.; and Inskeep, E. K.** (1996). Embryotoxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. *Biol Reprod* 54: 531-37.
- Buratini, Jr.; Price. J.; Visintin. C. A.; Bó, G. A.** (2000). Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, 54: 421-432.
- Burnside, E. B.** (1992). Estrategias globales de selección en los bovinos de leche. *Frisona Española*. 62: 37-40.
- Cabodevila, J.** (1997). Transferencia de embriones y biotécnicas derivadas. Therios, suplemento especial, *Reproducción en bovinos*, 35-40.



- Cabodevila, J.; & Teruel, M.** (2001). Criopreservación de embriones bovinos. En: *Biotechnología de la reproducción* (G. A. Palma, eds.). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarse, Argentina, Capítulo X, 49-174.
- Cabodevila, J.; & Torquati, S.** (2008). Capítulo: Superovulación, In: *Biotechnología de la Reproducción* (G.Palma), Ediciones INTA, Argentina.
- 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, 125-135.
- Callesen, H.; Liboriussen, T.; and Greve, T.** (1996). Practical aspects of multiple ovulationembryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 215-226.
- Campanile, G.; Di Palo, R.; Neglia, G.; Vecchio, D.; Gasparrini, B.**(2007). Corpus luteum and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology*, 67: 1393-1398.
- Carter, F.; Forde, N.; Duffy, P.; Wade, M.; Fair, T.; Crowe, M. A.; Evans, A.C.; Kenny, D. A.; Roche, J. F.; Lonergan, P.** (2008). Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*, 20:368-375.
- Carvalho, J. B. P.; Carvalho, N. A. T.; Reis, E. L.; Nichi, M.; Souza, A. H.; Baruselli, P. S.** (2008). Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69: 167-75.
- Cassell, B.** (1990). Finding bull mothers isn't getting any easier. *Hoard's Dairyman*: 617: 12-16.
- Castro, A.** (2007) Condición Corporal. *Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA*.
- Chagas, J.; Lopez, L.; Robalo, J.** (2002). Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*. 58: 51-59.
- Chebel, R. C.; Demétrio, D. G. B.; Metzger, J.** (2008) Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*, 69: 98-106.
- 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.
- Christensen, L. G.** (1991). Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology*, 35: 141-156.
- Chupin, D.; Combarous, Y.; Procureur, R.** (1985). Different effect of LH on FSH induced superovulation in two breeds of cattle *Theriogenology*, 23: 184.
- Chupin, D., Cognie, I.; Combarous, R.; Procureur, R.; and Saumende, J.** (1988). Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. In: *Follicular growth and ovulation rate in farm animals*. Eds.: J.F. Roche and D. O'Callaghan. Martinus Nijhoff Pub. 63-71.
- Clemente, M, de la Fuente, J.; Fair, T.; Al Naib, A.; Gutierrez-Adan, A.; Roche, J. F.; Rizos, D.; Lonergan, P.** (2009). Progesterone and conceptus elongation in



cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, 138:507-517.

Código Sanitario para los Animales Terrestres 2010 © Oficina Internacional de Epizootias (OIE).

Colazo, M. G.; and Mapletoft, R. J. (2014a). A Review of Current Timed-AI (TAI) Programs for Beef and Dairy Cattle. *Canadian Veterinary Journal* (In press).

Colazo, M. G.; and Mapletoft, R. J. (2014b). Fisiología del ciclo estral bovino. Livestock Research Branch, Alberta Agriculture and Rural Development, Edmonton, Alberta, Canada WCVN, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

Colazo, M. G.; Ambrose, D. J.; and Mapletoft, R. J. (2007). Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with pLH or GnRH. *J Dairy Sci*, 90: 328.

Coleman, D. A.; Dailey, R. A.; Leffel, R. E.; and Baker, R. D. (1987). Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *J. Dairy Sci.*, 70: 858-866.

CONAFE 2015. Petición personal de información.

Custer, E. E.; Beal, W. E.; Wilson, S. J.; Meadows, A. W.; Berardinelli, J. G.; Adair, R. (1994). Effect of melengestrol acetate (MGA) or progesterone-releasing intravaginal device (PRID) on follicular development, concentrations of estradiol-17. and progesterone, and LH release during an artificially lengthened bovine estrous cycle. *J Anim Sci.*, 72: 1282-1289.

Cutaia, L.E. (2001). Nuevos tratamientos para disminuir la mortalidad embrionaria en vacas de carne y leche. *Instituto de Reproducción Animal Córdoba* (IRAC).

Cutini, A.; Teruel, M.; Cabodevila, J. (1999). Criopreservación de embriones de especies de interés pecuario. *Rev. Arg. Prod. Anim.*, 19:447-469.

Cutini, A.; Teruel, M.; Cabodevila, J. (2000). Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Revista Taurus* N° 7: 28-39 y N° 8; 35- 47.

Dailey, R. A.; Inskeep, E. K.; Lewis, P. L.; (2002). Pregnancy failures in cattle: a perspective on embryo loss. In: *Proceedings of the XVIIIth International Conference on Reproduction of Farm Animals*, Slovakia.

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.

De la Fuente, J. (2009) Reproducción asistida en el vacuno de leche, selección y superovulación, *Máster Interuniversitario de Zootecnia y Gestión Sostenible. Instituto de Estudios de Postgrado*, Universidad de Córdoba.

De la Fuente J. (2010). Transferencia de embriones en ganado bovino. *Capítulo XXIV Reproducción bovina*.

De la Fuente J.; Cocero M. J.; López Sebastián A.; Barragan, C. (1988). Efecto de la utilización de distintas gonadotropinas exógenas (FSH y PMSG) sobre la cantidad y calidad de los embriones producidos por la hembra vacuna. *ITEA* 79: 3-11.



- De la Fuente J.; Monge A.; Cocero M. J.; Barragan, C.** (1989). Producción y conservación de embriones vacunos. *4º Congreso Internacional de Reprod. Anim. e I.A.* León. p. 58.
- De la Fuente, J.; Fuentes, S.; Martínez Bello, D.;** (2012). La transferencia de embriones, una herramienta más para el veterinario clínico. *In: XVII Congreso Internacional de Medicina Bovina, ANEMBE*, Santander 18-20 abril 2012.
- De Leeuw, A.M.; den Daas, J. H.; Kruip, T. A.; and Rall, W. F.** (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, 1505-1507.
- DeSouza, M. M.; & Murray, M. K.** (1995) An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* 136: 2485-96.
- Deyo, C. D.; Colazo, M.G.; Martinez, M. F.; and Mapletoft, R. J.** (2001). The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. *Theriogenology*, 55: 513.
- Directiva 89/556/CEE** del Consejo, de 25 de septiembre de 1989, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones procedentes de terceros países de embriones de animales domésticos de la especie bovina.
- Directiva 2003/74/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta agonistas en la cría de ganado.
- Dochi, O.; Yamamoto, Y.; Saga, H.; Yoshiba, N.; Kano, N.; Macda, J.;** (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.
- Domínguez, J. C.** (2008). El puerperio: Control reproductivo y patología. *En: Gestión Técnica de Granjas de Vacuno Lechero: Aspectos de Manejo*, 183-213. Secretariado de Publicaciones. Universidad de León.
- Domínguez, J. C.; Tejero, J.; Alegre, B.; Álvarez, F.; Iglesias, R.; González, R. y García, J. C.** (2008). CiDR una nueva oportunidad en el control reproductivo. Experiencia en novillas. *Mundo Ganadero*, 213: 20-23.
- Domínguez, J. C.; Tejero, J.; Alegre, B.; Álvarez, F.; Iglesias, R.; González, R. y García, J.C.** (2012). Manejo reproductivo del ganado vacuno lechero mediante sincronización hormonal del celo. *Ganadería*, 78: 30-35.
- Donaldson, L.** (1984). The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. *Theriogenology*, 22: 97-99.
- Donaldson, L. E.** (1985). Matching of embryo stage and grades with recipients oestrus synchrony in bovine embryo transfer. *Vet. Rec.*, 117: 489-491.
- Donaldson, L .E.** (1986). Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle. *Vet. Rec.*, 118: 661-663.



- Drost, M.** (1992). *The Drost Project Visual Guide*. [consulta: Septiembre 2015] [En línea]: [http://www.drostproject.org/drost_information.html].
- Drost, M. Ambrose, J. D.; Thatcher, M. J.; Cantrell, C. K.; Wolfsdorf, K. E.; Hasler, J. F.; Thatcher, W. W.** (1999). Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology*, 52: 1161-1167.
- Duica, A.; Tovio, N.; Grajales, H.** (2007). Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria, julio-diciembre, numero 014. Universidad de La Salle, Bogota, Colombia*, 107-124
- Dunlap, S. E.; Vincent, C. K.** (1971). Post- Influence of postbreeding thermal stress on conception rate in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 32: 1216-1218.
- Dyce, K. M.; Sack, W. O. and Wensing, C. J. G.** (1999). *Anatomía Veterinaria. 2ª Edición*. Editorial: McGraw-Hill. Interamericana, Madrid, España.
- Ealy, A.D.; Drost, M.; Hansen, P. J.** (1993). Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects on maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci.*, 76: 2899-2905.
- Edwards, et al.** (1997), citado por **Barati, F.; Niasari-Naslaji, A.; Bolourchi, M.; Razavi, K.; Naghzali, E.; Sarhaddi, F.** (2007). Pregnancy rates of frozen embryos recovered during winter and summer in Sistani cows. *Iranian J Vet Res* 2007, 8: 151-15.
- Elli, M.; Gaffuri, B.; Frigerio, A.; Zanardelli, M.; Covini, D.; Candiani, M.; and Vignali, M.** (2001). Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction* 121: 151-54.
- Ellington, J. E.; Foote, R. H.; Farrell, P. B.; Hasler, J. F.; Webb, J.; Henderson, W. B.; and McGrath, A. B.** (1991). Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*, 36: 1035-1042.
- Elrod, C.; Butler, W.** (1993). Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *Journal Animal Science*, 71.
- Elsden, R. P.; Hasler, J. F. & Seidel, G. E. Jr.** (1976) Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, 6: 523-532.
- Evans, A.; Fortune, J.** (1997). Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 138: 2963-2971.
- Everton, L.; Baruselli P.** (2003) Sincronización de receptoras cruce por cebú en condiciones tropicales. *Cuarto seminario de reproducción de grandes animales (memorias)* Bogotá 2003.
- Ferguson, J. K. W.** (1941). A study of the motility of intact uterus at term. *Surg. Gynecol. Obstet.* 73: 359-366.
- Ferguson, J. D.; Galligan, D.T.; Thomsen, N.** (1994). Principal descriptors of body condition score in Holstein Cows. *J Dairy Sci.*, 77: 2695-2703.
- Fieni, F.; Tainturier, D.; Bruyas, J. F. and Battu, I.** (1995). Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache. *Bull GTV*, 4: 35-49.



- Figueriedo, R.; Barros, C.; Pinheiro, O.; Soler, J.** (1997). Ovarian follicular dynamics in Nelore breeds (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, 47, 1489-1505.
- Findlay, J. K.; and Clarke, I. J.** (1987). Regulation of the secretion of FSH in domestic ruminants. *J.Reprod. Fertil. Suppl.*34: 27.
- Fleming, J. A.; Choi, Y.; Johnson, G. A.; Spencer, T. E. and Bazer, F. W.** (2001). Cloning of the ovine estrogen receptor-alpha promoter and functional regulation by ovine interferon-tau. *Endocrinology*, 142: 2879-2887.
- Forde, N.; Beltman, M.; Lonergan, P.; Diskin, M.; Roche, J.; Crowe, M.** (2011a). Oestrus cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 163-169.
- Forde, N.; Carter, F.; Spencer, T. E.; Bazer, F. W.; Sandra, O.; Mansouri-Attia N.; Okumu, L. A.; Mcgettigan, P. A.; Mehta, J. P.; McBride, R; O'Gaora, P.; Roche, J. F.; Lonergan, P.** (2011b). Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biol. Reprod.*, 85: 144-156.
- Franco, M.; Thompson, P. M.; Brad, A. M.; Hansen, P. J.** (2006) Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone at Days 11, 14 or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. *Theriogenology* 2006; 66, 4: 945-54.
- Fuentes, S.** (2000) Utilización de tratamientos hormonales para la sincronización de novillas receptoras de embriones. *Producción Animal* 160: 26-32.
- Fuentes, S.; and de la Fuente, J.** (1997). Different synchronization treatments for direct embryo transfer to recipients heifers. *XIII Sci. Meeting AETE*. Lyon, 148.
- Fuentes, S.; and de la Fuente, J.** (2000). Holstein superovulatory response in commercial dairy herds treated with estradiol 17 β and progesterone in different days of the intravaginal progestagen treatment. *Theriogenology* vol. 53. Pág 497
- Fuentes, S.; de la Fuente, J.** (2001) Incremento de las tasas de gestación de embriones bovinos congelados transferidos en combinación con flunixin meglumine. *ANEMBE, proceedings* 2001
- Fuentes, S.; de la Fuente, J.** (2007) Tasas de gestación de novillas receptoras sincronizadas con Gonadotropina Coriónica Equina u Hormona Foliculo Estimulante. *Acta Scientiae Veterinariae* 2007. 35 (Supl. 3): 767-772.
- Fuentes, S.; de la Fuente, J.** (2010a). Superovulation by split FSH dose with or without 17 β -estradiol in beef cows. XXIV Reunión Anual de la Sociedad brasileña de Trasplante de Embriones. *Acta Scientiae Veterinariae* 38 (2): 703
- Fuentes, S.; de la Fuente, J.** (2010b). Superovulation by split FSH dose in beef cows. *26th AETE Conference*, Kuopio, Finland, 150.
- Fuentes, S.; de La Fuente, J.** (2011). Situación actual del trasplante de embriones en Europa; una década de actividad. *Boletín de ANEMBE*, 91: 40-45.
- Fuentes, S; Liébana, E.** (2012). Sincronización de receptoras: factores que pueden afectar al éxito final del trasplante de embriones. *XVII Congreso Internacional Anembe Medicina Bovina*, libro de ponencias, 59-63.
- Fuentes, S., Payas, A., Ugarte, C., Montoro, L. y de la Fuente, J.** (1991). Tasas de gestación en el programa de T.E. del País Vasco. Resultados preliminares. *ITEA* 11, I: 73-75.



- Fuentes, S.; Ruiz, D.; Vera, P.; Castro, A.; Moreno, I.; Liebana, E.; de la Fuente, J.** (2010). Holstein donors response using or not estradiol 17- β in the superovulatory treatment. *Reproduction, Fertility and Development*. 22: 361.
- Fuentes, S; Vigil, E.; Picot, A.; Quintín F. J. y Sanz, A.** (2012) Programa de conservación mediante trasplante de embriones de la raza Serrana de Teruel, XVII Congreso Internacional Anembe Medicina Bovina, libro de ponencias, 252-253
- García, G. J. K.; Seidel, G. E. Jr.; Elsdén, R. P.** (1982). Efficacy of shortened FSH treatment for superovulating cattle. *Theriogenology*. 17: 90-97.
- Geary, T. W.; Whittier, J. C.; Downing, E. R.; LeFever, D. G.; Silcox, R. W.; Holland, .D.; Nett, T. M.; Niswender, G. D.** (1998). Pregnancy rates of post partum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate B or Ovsynch protocol. *J Anim Sci*; 76:1523-1527.
- Geisert, R.; Morgan, G.; Short, E. and Zavy, M.** (1992). Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 4, 3: 301-305.
- Ginther, O. J.; Kastelic, J.; Knop, L.** (1989a). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrus cycle. *Animal Reproduction Science*, 20: 187-200.
- Ginther, O. J.; Kastelic, J.; Knop, L.** (1989b). Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, 32: 787-795.
- Ginther, O. J.; Knop, L.; Kastelic, J. P.** (1989c). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.*, 87: 223-230.
- Ginther, O. J.; Wiltbank, M.; Fricke, P.; Gibbons, J.; Kot, K.** (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 55: 1187-1194.
- Ginther, O. J.; Beg, M. A.; Bergfelt, D. R.** (2001). Follicle selection in monovular species. *Biology of reproduction*, 65: 638-647.
- Gómez, C.** (2005). Transferencia de embriones experiencias en Colombia. *Memorias, congreso internacional de reproducción bovina* (Intervet), Bogotá Colombia. 2005. 155-158.
- Gonella, A.; Grajales, H.; Hernández, A;** (2010). Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Rev. MVZ. Córdoba*. 15, 1: 1976-1984.
- Gonzales-Stagnaro, C.** (2001). *Reproducción bovina*. Venezuela: Fundación Girarz, 2001.
- González Recio, O.; Jiménez-Montero, J. A.; Alenda, R.** (2010). La selección genómica aplicada a un programa de mejora en vacuno de leche. *Frisona Española* 177: 104-107.
- Gordon, I.** (1999) *Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos*. Zaragoza España. Ed. Acribia.
- Gordon, I.** (2004). *Tecnología de la reproducción de animales de granja*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. 441.



- Görlach, A.** (1999). *Transferencia de embriones en el ganado vacuno*. Zaragoza España. Ed. Acribia.
- Gottsch, M. L.; Cunningham, M. J.; Smith, J. T.; Popa, S. M.; Acohido, B. V.; Crowley, W. F.; Seminara, S.; Clifton, D. K.; Steiner, R. A.** (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145: 4073-4077.
- Green, M.; Hunter, M. and Mann, G.** (2005). Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 88, 3-4: 179-189.
- Greve, T.** (1982). Embryo transplantation in dairy cattle: An attempt to analyse factors that may affect embryo number and quality. In: *2nd World Conference on ET and IVF*. Eds.: C. Merieux, M. Boneau, 251-276.
- Greve, T. and Lehn-Jensen, H.** (1982). The effect of hCG administration on pregnancy rate following non-surgical transfer of viable bovine embryos. *Theriogenology*, 17:91.
- Gross, T.S.; Thatcher, W. W.; Hansen, P. J.; Johnson, J. W.; Helmer, S. O.** (1988). Presence of an intracellular endometrial inhibitor of prostaglandin synthesis during early pregnancy in the cow. *Prostaglandins*, 35: 359-378.
- Hahn, J.; Hahn, R.; Baumgartner, G.; Lotthammer, K. H.; Lorrman, W.; Schneider, U.; Traub, J. and Zoder H. F.** (1977). Experiments to improve results of ova collection and transfer in cattle by preselection of donors and recipients. *Zuchthyg.* 12: 68-76.
- Hall, L. W.** (1974). Caudal epidural analgesia. En: *Veterinary Anesthesia and analgesia*. Baillière Tindall, England. 114-128.
- Hanselmann, D.** (1995). Was beeinflusst den Erfolg beider Superovulation. *Tierzuchler*, 8: 28-29.
- Hansen, P. J.** (2013). Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on embryonic development in cattle. *Anim Reprod.*, 10, 3: 322-333.
- Hasler, J.F.** (1992). Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 75: 2857-2879.
- Hasler, J. F.** (2001) Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56: 1401-1415.
- Hasler J.F.; McCauley, A. D.; Schermerhorn, E. C.; Foote, R. H.** (1983). Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19: 83-99.
- Hasler J.F.; McCauley, A. D.; Lathrop, W. F. and Foote, R. H.** (1987). Effect of donor recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27: 139-168.
- Hasler J.F.; Henderson, W. B.; Hurtgen, P. J.; Jin, Z. Q.; McCauley, A. D.; Mower, S. A.; Neely, B.; Shuey, L. S.; Stokes, J. E. and Trimmer, S. A.** (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-153.
- Hasler J.F.** (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81, 1: 152-169.



- Helmer, S.; Britt, J.** (1986). Fertility of dairy cattle treated with human corionic gondotropin (hCG) to stimulate progesterone secretion. *Theriogenology*, 26, 5: 683-695.
- Herd, D. B. y Sprott, L. R.** (1986). *Body condition, nutrition and reproduction of beef cows*. Texas Agric. Ext. Serv. Bull B.1526.
- Heyman, Y.; Chesné, P.; Chupin, D. and Ménézo Y.** (1987). Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27: 477-484.
- Hill, B. R.** (1996). Ensayos a campo con embriones congelados con glicerol vs etilenglicol. *CABIA* 27: 30-33.
- Hinshaw, R. H.** (1999). Formulating ET contracts. Annual Meeting Soc for *Theriogenology*, Nashville, USA, 399-404.
- Hinshaw, R. H.** (2010). Comparasion of GnRH and estradiol 17 β for follicle turnover in bovine superovulation protocols. *Procedings American Embryo Transfer Association 2010*. 43-44.
- Hockett, M. E.; Rohrbach, N. R.; and Schrick, F. N.** (2004). Alterations in embryo development in progestogen-supplemented cows administered prostaglandin F2 α *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 73: 227-36.
- IETS; George, P.** (2014). 23rd *Annual report of the data collected globally during 2014 for embryo transfer activity in 2013*.
- Jiménez, C.** (2005). Enfermedades transmisibles por la técnica de transferencia de embriones. *Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina*. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia: 35-41.
- Jousan, D.F.; Hansen P. J.** (2004). Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol Reprod.*, 71: 1665-1670.
- Kanawaga, H.** (1993). *Bovine Embryo Transfer*. Published by Japan International Cooperation Agency (JICA). Second printing, 168.
- Kaplan, J. H.** (2002). Biochemistry of K.ATPase. *Annu Rev Biochem*, 71: 511-535.
- Kastelic, J. P.** (2001). Conceptos actuales en la detección de celos en Bovinos. *Cuarto Simposio Internacional de Reproducción Animal*, Huerta Grande, Córdoba, 73-82
- Kastelic, J. P.; Ginther, O. J.** (1991) Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci.*, 26: 13-24.
- Kastelic, J. P.; Pierson, R. and Ginther, O.** (1990). Ultrasonic Morphology of a corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*, 34, 3: 487-498.
- Kinder, J.E.; Kojima. F.N. Bergfeld, E. G. M.; Wehrman, M. E.; Fike, K.E.** (1996) Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci.*, 74: 1424-1440.
- Klisch, K.; Wooding, F. B. P. and Jones, C. J. P.** (2009). The Glycosylation Pattern of Secretory Granules in Binucleate Trophoblast Cells is Highly Conserved in Ruminants. *Placenta*.



- König, I.; Rommel, P.** (1987).. Gewinnung der Embryonen. En: Embryotransfer - Rind. Ministerium für Land- Forst- und Nahrungsgüterwirtschaft und des VEK Tierzucht. *VEB deutscher Landwirtschaftsverlag*, 69-75.
- Lamberson, J. and Lambeth, S.** (1986). Repeatability of response to superovulation in Brangus cows. *Theriogenology*, 26: 643-648.
- Lane, E. A.; Austin, E. J. and Crowe, M. A.** (2008). Oestrous synchronisation in cattle Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Animal Reproduction Science* 109: 1-16.
- Lange, H.** (1995). Cryopreservation of bovine embryos and demi-embryos using ethylene glycol for direct transfer after thawing. *Theriogenology*, 43: 258-258 (1).
- Langford, G. A.; Marcus, G. J.; Hackett, A. J.; Ainsworth, L. and Wolynetz, M. S.** (1980). Influence of estradiol-17 beta on fertility in confined sheep inseminated with frozen semen. *J. Anim. Sci.*, 51: 911-916.
- Lauderdale, J. W.; Seguin, B. E.; Stellflug, J. R.; Chenault, R.; Thatcher, W. W.; Vincent, C. K. and Loyancano, A. F.** (1974). Fertility of cattle following PGF₂ α injection. *J. Anim.Sci.*, 38: 964-967.
- Lee, W. Y.; Song, K. W.; Lim, K T.; Lee, S. J., Lee, B.C.; Jang, G.** (2012). Influence of factors during superovulation on embryo production in korean Holstein cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, 74(2): 167-174.
- Lemaster, J. W.; Seals, R. C.; Hopkins, F. M. and Schrick, F. N.** (1999). Effects of administration of oxytocin on embryonic survival in progestogen supplemented cattle. *Prostaglandins*, 57: 259-268.
- Lequarre, A.; Vigneron, C.; Ribaucour, F.; Holm, P.; Donnay, I.; Dalbies-Tran, R.; Callesen, H.; Mermillod, P.** (2004). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*, 63, 3: 841-859.
- Lerner, S. P.; Thayne, W. V.; Baker, R. D.; Hensche, T.; Meredith, S.; Inskoop, E. K.; Dailey. R. A.; Lewis, P. E.; Butcher, R. L.** (1986). Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63:176-183.
- Liebrich, J.** (1991). Untersuchung zur in-vitro weiterentwicklungskapazität nach transfer produzierter rinderembryonen. *Diss. München*, 1-129.
- Lindner, G. M. and Wright, R. W.** (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-416.
- Lindner, G. M.; Anderson, G.B.; Bon Dutant, R. M. and Cupps. P. T.** (1983). Survival of bovine embryos stored at 4° C. *Theriogenology*, 20: 311.
- Lindsell, C.E.; Murphy, B. D. and Mapletoft, R. J.** (1986a). Superovulatory endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, 26: 209-219.
- Lindsell, C.E.; Rajkumar, k.; Manning, A. W.; Emery, S. K.; Mapletoftl, R. J.; Murphy, B. D.** (1986b). Variability in FSH/LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogenology*, 25: 167.



- Ling, Z. J.; Shi, D. S.; Huang, H. M.; Wei, Y. M.; Jiang, R. M. and Lu, K. H.** (1995). Pregnancy rate following transfer of IVF bovine embryos at different developmental stages. *Theriogenology*, 43:266.
- Lonergan, P.; Evans, A.C.O.** (2015). Relevancia de la progesterona para el establecimiento de la gestación y su manipulación exógena. *XX Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina, Burgos junio 2015*, 165-169.
- Looney, C. R.; Oden, A. J.; Massey, J. M.; Jhonson, C. A. and Godke, R. A.** (1984). Pregnancy rates following hCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology*, 21: 246.
- Looney, C.; Westhusin, M, Bondioli, K.** (1989) Effect of cooling temperatures on pre-compacted bovine embryos. *Theriogenology*, 31: 218.
- Looney, C. R.; Broek, D. M.; Gue, C. S.; Funk, D.J. And Faber, D.C.** (1996). Field experiences with bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. *Theriogenology*, 45, 1: 170.
- Looney, C. R.; Nelson, J. S.; Schneider, H. J.** (2006) Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*, v.65, p.201-209, 2006.
- Looney, C. R.; Stutts, K. J.; Novicke, A. K.; Chiles, K. C.; Tijernia, S. E.; Miranda, A. R.; Romo, S.; Forrest, D. W.** (2010). Advancements in estrous synchronization of brahman-influenced embryo transfer recipient females. *American embryo Transfer Association*, 17-22.
- Lopes, A. S.; Butler, S. T.; Gilbert, R.O.; Butler, W. R.** (2007). Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim Reprod Sci.*, 99: 34-43.
- Lozano-Domínguez, R. R.; Asprón-Pelayo, M .A.; Vásquez- Peláez, C.G.; González-Padilla, E.; Aréchiga-Flores.** (2010). Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Rev. Mex. Cienc. Pecu* 1, 3: 189-203.
- Lucy, M. C.** (2000). Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.*, 65: 2204-2210.
- Luiz, E. R.** (2002). *Dinâmica Folicular em Bovinos*. Monografía. UNESP-Botucatu.
- Lumb, W. V.; Jones, E. W.** (1979). Anestesia espinal. En: *Anestesia Veterinaria. Compañía Editorial Continental, S.A. México*, 417-435.
- Lynch, C.; Kenny, D.; Childs, S.; Diskin, M.** (2010). The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival. *Theriogenology*, 73: 190-198.
- Macmillan, K. L.; Thatcher, W. W.** (1991). Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod.*, 45: 883-889.
- Macmillan, K.L.; Taufa, V. K.; Hayman, D. L.** (1994). Pregnancy rates in lactating dairy cows used as recipients for frozen/thawed embryos and receiving supplemental progesterone. In: *New Zealand Embryo Transfer Workshop*, Hamilton, NZ. Hamilton: NZETW.
- Madureira, E.H.; Marques, M. O.; Baruselli, P.; Nasser, L. F.; Rodrigues, C.A.** (2004) Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas nelore com



diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise Retrospectiva). *Acta Scientiae Veterinariae* .2004. 32: 228.

- Malhi, S.; Adams, G .P.; Singh, J.** (2005). Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal and endocrine characteristics. *Biol Reprod*, 73: 45-53.
- Mann, G.; Lamming, G.** (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121: 175-180.
- Mann, G. E.; Fray, M. D.; Lamming G. E.** (2006). Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet J.*, 2006, 171: 500-503.
- Mann, G.; Robinson R. and Hunter, M.** (2007). Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. *Theriogenology*, 67, 7: 1256-1261.
- Mantovani, A.; Baruselli, P.; Bó, G. A.; Cavalcante, A. Gacek, F.** (2002) Aumento de las dimensiones del folículo dominante y del cuerpo lúteo, concentración plasmática de progesterona y de la tasa de aprovechamiento de receptoras de embriones bovinos sincronizadas con CIDR-B® por tiempo prolongado. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*.
- Mantovani A. P.; Reis, E.L.; Bó, G. A.; Baruselli, P. S.; Gacek, F.** (2004). Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR®) on the induction of persistent follicles in bovine embryo recipients. *15th International Congress on Animal Reproduction*, Porto Seguro, Brazil.
- Mapletoft, R. J.** (1980). Embryo transfer for the practitioner. Proc. 13th Ann. Meet. Am. Assoc. Bovine Pract. Toronto, Canadá, 154-162.
- Mapletoft, R. J.** (1989). La tecnología de la transferencia embrionaria. Primera parte. revista CABIA, 17: 45-65.
- Mapletoft, R. J.; Pierson, R. A.** (1993). Factors affecting superovulation in the cow: practical consideration. *IETS Embryo Transfer Newsletter*, 11: 14-24.
- Mapletoft, R. J. & Bó, G. A.** (2013). ¿Qué novedades hay en la superovulación de ganado vacuno? *X Simposio Internacional De Reproduccion Animal – Irac*, 2013, 257-267.
- Mapletoft, R. J.; 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.
- Mapletoft, R. J.; García, A. y González A.** (1988). La transferencia de embriones en la vaca. *CADIA*, 11:41-50.
- Mapletoft, R. J.; Bó, G.A.; Murphy, B. D.** (1991). The effect of biological activity of gonadotropins on superovulation in the cow. *Proc 9 Congreso brasileiro de reproducción animal 1991*. 1:74-92.
- Marques, M.O.; Nasser, L.F.; Silva, R. C. P.; Bó, G. A.; Sales, J. N. S.; Sá Filho, M. F.; Reis; E. L.; Binelli, M.; Baruselli, P. S.** (2012). Follicular dynamics and pregnancy rates in *Bos taurus* x *Bos indicus* embryo transferrecipients treated to



- increase plasma progesterone concentrations. *Animal Reproduction*, 9, 2: 111-119.
- Martínez Bello, D.** (2012). Métodos de sincronización de receptoras. Una evaluación desde el punto de vista práctico. *XVII Congreso Internacional Anembe Medicina Bovina*, libro de ponencias, 63-66.
- Martinez, M. F.; Adams, G. P.; Bergfelt, D.; Kastelic, J. P.; Mapletoft, R. J.** (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci.*, 57: 23-33
- Martinez, M. F.; Kastelic, J. P.; Adams, G. P.; Cook, R. B.; Olson, W. O.; Mapletoft, R. J.** (2002) The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology*, 57: 1049-1059.
- Martins, A.; Jr. Takada, L.; Abrahao R. G.; Freitas, C. P.; Calegari, R. S.** (2007). Follicular aspiration of calves oocytes by videoendoscopy: a successful approach to maximize in vitro bovine embryo production. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35: 1194
- Massey, J. M.; Oden, A. J.; Voelkel, S. A. and Godke, R. A.** (1983). Pregnancy rate following hCG treatment of bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*, 19:140.
- McCracken, J. A.; Luster, E.; Lamsa, J.C.;** (1999). Luteolysis: a neuroendocrine mediated event. *Physiological Reviews*, 79, 2: 263-323.
- McNaughtan, J. W.** (2004). The effect of prostaglandin inhibitor on pregnancy rates of heifer embryo transfer recipients. Brigham Young University. *All Theses and Dissertations*, 237.
- Merton, J. S.; de Roos, A. P. W.; Mullaart, E.; Ruigh, L.; Kaal L.; Vos, P. L. A. M. and Dieleman, S. J.** (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial applications of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59: 651-674.
- Meuwissen, T. H. E.; Hayes, B. J.;Goddard, M. E.** (2001). Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. *Genetics*, 157: 1819-1829.
- Moenter, S. M.; Brand. R. C.; Karsch, F. J.** (1992). Dynamics of gonadotropin releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology* 130: 2978-2984.
- Mollo, A.; Lora, M.; Faustini, M.; Romagnoli, S.; Cairoli, F.** (2007). Some factors affecting embryo transfer success in dairy cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6: 496-499.
- Momont, H. W.; Seguin, B. E.** (1984). Influence of the day of estrus on response to PGF2 α products: Implications for AI programs for Dairy cattle. *10th Int. Congr. Anim. Reprod.* 3: 336.
- Monniaux, D.; Chupin, D.; Saumande, J.** (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19: 55-81.
- Moor, R. M.; Kruip, A. M. and Grenn D.** (1984). Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology*, 21: 103-116.



- Moor, R. M.; Osborn, J.; Crosby, I.** (1985). Gonadotrophin-Induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J.Reprod.Fertil.*, 74:167.
- Moreno, D.; Cutaia, L.; Villata, L.; Ortisi, F.; Bó, G. A.** (2001). Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, 55, 1: 408.
- Moreno, D.; Cutaia, L.; Tríbulo, R.; Caccia, M.; Tríbulo, H.; Chesta, P.; Villata, M. L.; Bó G. A.** (2003). Fixed-Time embryo transfer in cows treated with progesterone vaginal devices and induced to ovulate with estradiol benzoate or hCG. *Theriogenology*, 59:307.
- Munar, C. J.; and Hasler, J.F.** (1989). Results of the first frozen bovine embryos exported from the USA to Argentina. *Theriogenology*, 31: 230.
- Munar, C. J.; Nigro, M. A.; Burry, E. R.; Vautier, R. A;** (1989). Análisis comparativo de la recuperación de embriones utilizando dos tipos de catéteres. En: IV Reunión Anual y II Reunión Internacional de la Sociedad Brasileira de Transferencia de Embriones. *Revista del Centro de Ciencias Rurales*, 19: 24.
- Munar, C.; Valdez, A. M.; y Crespo, P. J.** (1998). Transferencia de embriones bovinos criopreservados con etilenglicol y con glicerol. *1 er Simposio Internacional de Biotecnologías Aplicadas en Reproducción Animal*, 12 - 13 y 14 de Agosto de 1998, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Buenos Aires, 108-114.
- Murphy, R. J.** (1991). Superovulation in the cow. Effects of biological activity of gonadotropins. *Proc 12th Ann. Conv. AETA*. 1991, Portland Maine.
- Murphy, B.; Martinuk, S.** (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*. 12: 27-44.
- Murphy, M.; Boland, M.; Roche, J.** (1990). Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post partum beef suckled cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90: 523-533.
- Nasser, L.; Adams, G. P.; Bó, G. A.; Mapletoft, R. J.** (1993). Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40: 713-724.
- Nasser, L. F.; Reis, E. L.; Oliveira, M. A.; Bó, G. A.; Baruselli, P. S.** (2004). Comparison of four synchronization protocols for fixed time embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos Taurus* recipients. *Theriogenology*, 62, 9: 1577-84.
- Neumann, C.; Schönmath, G. and Neumann, K.** (1995). Factors influencing the result of embryo transfer in cattle. *Anim. Res. Dev.*, 41: 91-100.
- Newcomb, R.** (1979). Surgical and nonsurgical transfer of bovine embryos. *Vet. Rec.*, 105: 432-434.
- Newcomb, R and Rowson, L. E. A.** (1975). Conception rate after uterine transfer of cow eggs in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 43: 539-541.
- Newcomb, R. and Rowson, L. E. A.** (1976). Aspects of the non-surgical transfer of bovine egg. *Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.*, 3: 262-265.
- Newcomb, R. and Rowson, L. E.** (1980). Investigation of physiological factors affecting nonsurgical transfer. *Theriogenology*, 13: 41-49.



- Newcomb R., Rowson L. E. A. and Trounson, A.** (1976). The entry of superovulated eggs into the uterus. In "Eggs transfer in cattle" *CEE Seminar*, 1-18.
- Newcomb, R., Christie, W. B. and Rowson, L. E. A.** (1978). Comparison of the fetal survival rate in heifers after the transfer of an embryo surgically to one uterine horn and nonsurgically to the other. *J. Reprod. Fert.*, 52: 395-397.
- Nibart, M. and Humblot, P.** (1997). Le tranfer direct des embryons bovine congelés. *M. Elev. Et Insem. Fev.*, 2: 3-11.
- Nieman, H.; Shacher, B. and Elsaesser, F.** (1985). Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on day of non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 23, 4: 631-639.
- Nishigai, M.** (2003) The developmente and prevalence of the transfer technique for frozen-thawed embryos of Japaonese black beef cattlein Tochigi Prefecture. *J. Reprod. & Development*, vol. 49, N°. 1.
- Niswender, G.; Juengel, J.; McGuire, W.; Belfiore, C. and Wiltbank, M.** (1994). Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. *Biology of reproduction* 50: 234-247.
- Niswender, G. D.; Juengel, J. L.; Silva, P. J.; Rollyson, M. K.; McIntush, E. W.** (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000; 80:1-29.
- Nogueira, M. F.; Melo, D. S.; Carvalho, L. M.; Fuck, E. J.; Trinca, L. A.; Moraes Barros, C.** (2004) Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 α and eCG? *Theriogenology*, 61: 1283-1290.
- Nogueira; Ériklis; Saravi Cardoso Gabriel ; Romero Marques Heitor Júnior Alexandre Menezes Dias ^{III} ; Luís Carlos Vinhas Ítavo ^{III} ; Juliana Corrêa Borges** (2012) Efecto de la raza y el cuerpo lúteo en la tasa de preñez de las hembras receptoras bovina R. *Bras. Zootec.*, vol.41 n° 9 Viçosa septiembre 2012.
- Odde, K. G.** (1990). A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci.*, 68: 817-830.
- Odensvik, K. and Fredriksson G.** (1993). The effect of intensive flunixin treatment during the postpartum period in the bovine. *Zentralbl. Veterinarmed A.*, 40: 561-568.
- Odensvik, K.; Duchens, M. and Gustafsson, H.** (1993). Does mechanical manipulation of the reproductive organs cause a prostaglandin release in the heifer during embryo transfer? *Acta vet. scand.*, 34: 219-221.
- Odensvik, K.; Gustafsson, H. and Kindahl, H.** (1998) The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 50: 35-44.
- O'Hara, L.; Scully, S.; Maillo, V.; Kelly, A. K.; Duffy, P.; Carter, F.; Forde, N.; Rizos, D.; Lonergan, P.** (2012). Effect of follicular aspiration just before ovulation on corpus luteum characteristics, circulating progesterone concentrations and uterine receptivity in singleovulating and superstimulated heifers. *Reproduction*, 143: 673-682.



- O'Hara, L.; Forde, N.; Carter, F.; Rizos, D.; Maillo, V. A. D.; Ealy, A. D.; Kelly, A. K.; Rodriguez, P.; Isaka, N.; Evans, A. C. O.; Lonergan P.** (2013). Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development.*, 26, 2: 328-336.
- Palma, G.** (2001) Biotecnología de la Reproducción. En: *Biotecnología de la Reproducción* (G. Palma), capítulo I, Ediciones INTA, Balcaré. Argentina.
- Palma, G.; Brem, G.** (1993). *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina*. Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 503.
- Pawlyshyn, V.; Linsell, C. E.; Braithwaite, M.; Mapletoft, R. J.** (1986). Superovulation of beef cows with FSH-P: A dose-response trial. *Theriogenology*, 25: 179.
- Pena, J.; Alenda, R.; Carabaño, M. J.; Jurado, J. J.** (1992). Evaluación genética Nacional del Frisón Español. *Bovínótcnia* , 7: 187-202.
- Pereira, R. M.; Carvalhais, I.; Pimenta, J.; Baptista, M. C.; Vasques, M. I.; Horta, A. E. M.; Santos, I. C.; Marques, M. R.; Reis, A.; Silva, M.; Pereira, C.; Marques, C.** (2008). Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryos culture. *Animal Reproduction Science*, Volume 106, Issues 3-4, 322-332.
- Peres, L. C.; Pincinato, D.; Cutaiia, L.; Bó, G. A.** (2006). Simplificación de los programas de transferencia de embriones a tiempo fijo en rodeos comerciales. *Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos*. IRAC (Instituto de Reproducción Animal Córdoba. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.)
- Pettit, W.** (1985). Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules. *Theriogenology*, 23: 13-16.
- Pierson, R. A. and Ginther O. J.** (1984). Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*, Vol. 21: 495-504.
- Pinheiro, O. L.; Barros, C.M.; Figueiredo, R.A.** (1998). Estrus behavior and the estrus-toovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandina F2a or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, 49: 667-681.
- Pinheiro, V. G.; A. F. Souza, M. F. Pegorer, R. A. Satrapa, R. L. Ereno, L. A. Trinca, C. M. Barros.** (2009). Effects of temporary calf removal and eCG on pregnancy rates to timed-insemination in progesterone-treated postpartum nellore cows. *Theriogenology*, 71, 3: 519-524.
- Ponsart, C.; Delcroix, P.; Rohou, A.; Jupin, L.; Humblot, P.** (2000). Sources of variation of pregnancy rates after transfer of bovine frozen embryos. *Proceedings of the 16th scientific meeting A.E.T.E.*, 158.
- Procedings 30th Annual Meeting A.E.T.E.** (2014). Dresden, Germany, 12th - 13th September 2014, 17-27.



- Purcell, S.H.; Beal, W.E.; Gray, K.R.** (2005). Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. *Theriogenology*, 64, 4: 867-878.
- Pursley, J. R.; Mee, M. O.; Wiltbank, M. C.** (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*, 44: 915-923.
- Pursley, J. R.; Kosorok, M. R. and Wiltbank, M. C.** (1997). Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci.*, 80: 301-306.
- Putney, D.; Mullins, S.; Thatcher, W. W.; Drost, M.; Gross, T. S.** (1989). Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim Reprod Sci.*, 19: 37-51.
- Rajakoski, E.** (1960). The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, end left-right variations. *Acta Endocrinologica*, 34: 1-68.
- Rall, W. F.** (1992). Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 28: 237-245.
- Real Decreto 855/1992**, de 10 de julio, por el que se fijan las condiciones de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones procedentes de terceros países de embriones de animales domésticos de la especie bovina.
- Real Decreto 2178/2004**, de 12 de noviembre, por el que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas de uso en la cría de ganado.
- Real Decreto 841/2011**, de 17 de junio, por el que se establecen las condiciones básicas de recogida, almacenamiento, distribución y comercialización de material genético de las especies bovina, ovina, caprina y porcina, y de los équidos.
- Rhodes, F.M.; Fitzpatrick, L. A.; Entwistle, K. W.** (1995). Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 104: 41-49.
- Rizos, D.; Carter, F.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Lonergan, P.** (2010). Contribution of the female reproductive tract to low fertility in postpartum lactating dairy cows. *J Dairy Sci.*, 93: 1022-1099.
- Roberts, R.M.; Ealy, A. D.; Alexenko, A. P.; Han, C. S.; Ezashi, T.** (1999). Trophoblast interferons. *Placenta*, 20: 259-264.
- Roche, J. F.** (1974) Synchronization of oestrous in heifers with implants of progesterone. *J Reprod Fertil.*, 41: 337-334.
- Roche, J. F.; Boland, M. P.** (1991). Turnover of dominant follicle in cattle of different reproductive states. *Theriogenology*, 35: 81-90.
- Rodina, T.; Cooke, F.; Hansen, P. and Ealy, A.** (2009). Oxygen tension and medium type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. *Animal Reproduction Science*, 111, 2-4: 173-188.



- Rodrigues, T.** (2003). Taxa de concepção conforme do tamanho do CL único (palpação retal) em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* inovulação após a detecção do estro. *SBTE. Brasil*. 14-21.
- Rodrigues, C. A.; Ayres, H.; Reis, E. L.; Madureira, E. H.; Baruselli, P. S.** (2004) Aumento de taxa de prenhez em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com o uso de eCG em diferentes períodos pós-parto.; *Acta Scientae veterinariae*, 32: 220.
- Rodrigues, C. A.; Teixeira, A. A.; Ferreira, R. M.; Ayres, H.; Mancilha, R. F.; Souza, A. H.** (2010). Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 118: 110-117.
- Roth, Z.; Arav, A.; Zeron, Y.; Braw-Tal, R.; Wolfenson, D.** (2001). Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heatstressed cows. *Reproduction*, 122: 737-744.
- Rowe, R. F.; Del Campo, M. R.; Eilts, C. L.; French, L. R.; Winch, R. P. & Ginther, O. J.** (1976). A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. *Theriogenology*, 6: 471-484.
- Rowe, R. F.; Del Campo, M. R.; Critser, J. K.; & Ginther, O. J.** (1980). Embryo transfer in cattle: Nonsurgical transfer. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1024- 1028.
- Rowson, L. E. A.; y Dowling D. F.** (1949). Citado por Seidel, G. E.; Elsdén Jr, R. P.; Nelson, L. D.; y Hasler J.F. (1978) In: *JR Sreenan (ed) Control of reproduction in the cow* Published by Martinus Nijhoff -The Hague Boston London, 268-280.
- Rowson, L. E. A.; Moor, R. M.; Lawson, R. A. S.** (1969). Fertility following egg transfer in the cow; effect of method, medium and synchronization of oestrus. *J. Reprod. Fert.*, 18: 517.
- Rowson, L. E. A.; Tervit, R.; and Brand, A.** (1972). The use of prostaglandins for synchronization of oestrus in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 29:145.
- Ruane, J.; and Smith C.** (1989). The genetic response possible in dairy cattle improvement by setting up a multiple ovulation and embryo transfer (MOET) nucleus scheme. *Genetic Selection Evaluation*, 21: 169-183.
- Sakase, M.; Kawate, N.; Nakagawa, C.; Fukushima, M.; Noda, M.; Takeda, K.; Ueno, S.; Inaba, T.; Kida, K.; Tamada, H.; Sawada.** (2007). Preventive effects of CIDR-based protocols on premature ovulation before timed-AI in Ovsynch in cycling beef cows. *The Veterinary Journal*, 173: 691-693.
- Sakatani, M.; Kobayashi, S.; Takahashi, M.** (2003). Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.*, 67: 77-82.
- Sales, K. J.; Milne, S. A.; Williams, A. R.; Anderson, R. A.; and Jabbour, H. N.** (2004). Expression, localization, and signaling of prostaglandin F2 α receptor in human endometrial adenocarcinoma: regulation of proliferation by activation of the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89: 986-93.
- Santos, J. E.; Thatcher, W. W.; Pool, L.; Overton, M. W.** (2001). Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J Anim Sci.*, 79, 11: 2881-94.



- Santos, J. E.; Thatcher, W. W.; Chebel, R.; Cerri, R.; Galvão, K.** (2004) The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci.*, 83: 513-535.
- Santos-Biase, W. K. F.; Biase, F. H.; Buratini Jr., J.; Balieiro, J.; Watanabe, Y. F.; Accorsi, M. F.; Ferreira, C. R.; Stranieri, P.; Caetano, A. R.; Meirelles F. V.** (2012). Single nucleotide polymorphisms in the bovine genome are associated with the number of oocytes collected during ovum pick up. *Animal Reproduction Science*, 134: 141-149.
- Sartori, R.; Barros C.** (2011). Reproductive cycles in bos indicus cattle. *Animal Reproduction Science*, 124: 244-250.
- Sartori, R.; Fricke, P.; Ferreira, J.; Ginther, O. & Wiltbank M.** (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, 65: 1403-9.
- Sartori, R.; Rosa, G. & Wiltbank, M. C.** (2002a). Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci.*, 85: 2813-22.
- Sartori, R.; Sartor-Bergfelt, R.; Mertens, S. A.; Guenther, J. N.; Parrish, J. J.; Wiltbank, M. C.** (2002b). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in Winter. *J Dairy Sci.*, 85: 2803-2812.
- Sartori, R.; Haughian, J., Shaver, R.; Rosa, G.; & Wiltbank M. C.** (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci.*, 87: 905-20.
- Sartori, R.; Bastos, M. R.; Mollo, M. R.; Martins, A. C.** (2007). Influencia da ingestão alimentar na produção de embriões bovinos. *Acta Sci Vet.*, 35: 869-873
- Sartori, R.; Mattos M. C. C.; Bastos, M. R.; Oliveira, T. A.; Guenther, J. N. & Wiltbank, M. C.** (2011). Conception rates of fresh and frozen in vivo-produced morulae and blastocysts in lactating dairy recipient cows. *Reproduction Fertility and Development*, 23: 178-9.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT Users Guide, version 6, 4 th ed. SAS Inst., Cary, NC.**; (2011).
- Savio, J. D.; Keenan, L.; Boland, M. P.** (1988). Pattern of growth of dominant follicles during oestrus cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83: 663-671.
- Savio, J. D.; Boland, M.; Roche, J.** (1990). Development dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88: 581- 591.
- Savio, J. D.; Thatcher, W. W.; Morris, G. R.; Entwistle, K.; Drost, M.; Mattiacci, M. R.** (1993). Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod Fert.*, 98: 77-84.
- Scenna, F. N.; Hockett, M. E.; Towns, T. M.; Saxton, A. M.; Rohrbach, N. R.; Wehrman, M. E.; Schrick, F. N.** (2005). Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 78. 1-4: 38-45.



- Schrick, F. N.; Hockett, M. E.; Wilkinson, S. C.; Rohrbach, N. R.; Edwards, J. L.; Wehrman, M. E.** (1999). Prostaglandin F_{2α} appears to directly influence early embryonic survival in cattle: Should this be a concern? *Proceedings of American Embryo Transfer Association 1999*. 10-21
- Schrick, F. N.; Hockett, M. E.; Towns, T. M.; Edwards, J. L.; Wehrman, M. E.; Wert, N. E.** (2000). Prostaglandin F_{2α} appears to directly influence early embryonic survival in cattle: would administration of Flunixin Meglumine be beneficial during embryo transfer. *Proceedings of American Embryo Transfer Association 2000*, 9-16
- Schrick, F. N., Scenna, F. N.; Edwards, J. L.; Hockett, M. E.; and Saxton, A. M.** (2003). More evidence for a direct interaction between prostaglandin F_{2α} and development of bovine embryos. *Proc. of CETA and AETA Joint Annu. Conv. Calgary, Alberta*, 43-52.
- Schroeder, H.** (2005). "Nutrición y sanidad en la biotecnología". *Simposio internacional biotecnología reproductiva y repoblamiento de la ganadería colombiana*. Universidad San Martín. Bogotá. Colombia. 2005.
- Seidel, G. E.; Elsdén Jr, R. P.; Nelson, L. D. and Hasler, J. F.** (1977) Methods of ovum recovery and factors affecting fertilization of superovulated bovine ova In: JR Sreenan (ed) Control of reproduction in the cow Published by Martinus Nijhoff - *The Hague Boston London*, 268-280
- Shea, B. F.** (1981). Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*, 15: 31-42.
- Shea, B. F.; Hines, D. G.; Lightfoot, D. E.; Ollis, G. W. and Olsen, S. M.** (1976). The transfer of bovine embryos. In: Egg Transfer in Cattle. ed. Rowson, L.E.A. 145-152. Commission of the European Communities. Luxembourg.
- Siqueira, L. G. B.; Torres, C. A. A.; Souza, E. D.; Monteiro, P. L. J.; Arashiro, E. K. N.; Camargo, L. S. A.; Fernandes, C. A. C.; Viana, J. H. M.** (2009a). Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology*, 72: 949-958.
- Siqueira, L. G. B.; Torres, C. A. A.; Amorim, L. S.** (2009b). Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 115: 18-28.
- Sirois, J.; Fortune, J.** (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, 39: 308-317.
- Smith, C.** (1988a). Applications of embryo transfer in animal breedings. *Theriogenology*, 29: 203-212.
- Smith, C.** (1988b). Genetic improvement of livestock using nucleus breeding units. *World Animal Review*, 65: 2-10.
- Smith, C. and Ruane J.** (1987). Use of sib testing as a supplement to progeny testing to improve the genetic merit of commercial review in dairy cattle. *Canadian Journal Animal Sciences*, 67: 985-990.
- Smith, W. L.; DeWitt, D. L. and Garavito, R.** (2000). Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem*, 69: 145-182.



- Son, D. S.; Choe, C. Y.; Cho, S. R.; Choi, S. H.; Kim, H. J.; Hur, T. Y.; Jung, Y. G.; Kang, H. G.; Kim, I. M.** (2007). A CIDR-based timed embryo transfer protocol increases the pregnancy rate of lactating repeat breeder dairy cows. *J Reprod Dev.*, 53: 1313-1318.
- Spell, A. R.; Beal, W. E.; Corah, L. R.; Lamb, G. C.** (2001). Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 56: 287-97.
- Spencer, T.; Burghardt, R. C.; Johnson, G. A.; Bazer, F. W.** (2004a). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci.*, 83: 537-550.
- Spencer, T.; Johnson, G. A.; Bazer, F. W. and Burghardt, R. C.** (2004b). Implantation mechanisms: insights from the sheep Center for Animal Biotechnology and Genomics, Public Health, Texas A&M University, 128: 657-668.
- Sreenan, J. M.** (1976). Egg transfer in the cow : Effect of site of transfer. *Proc. 8 th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., III*: 269-272.
- Sreenan, J. M. and Diskin, M. G.** (1987). Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in cow. *Theriogenology*, 27: 99-113.
- Sreenan, J. M.; Behaan, D. and Mulvehill, P.** (1975). Egg transfer in cow: Factors affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfer. *J. Reprod. Fertil.*, 44: 77-85.
- Stevenson, J. S.; Portaluppi, M. A.; Tenhouse, D. E.; Lloyd, A.; Eborn, D. R.; Kacuba, S.; DeJarnette, J. M.** (2007). Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *J Dairy Sci.*, 90: 331-40.
- Stock, A. E.; Fortune, J. E.** (1993) Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, 132: 1108-1114.
- Stringfellow, D. A.** (2000). *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones* (I.E.T.S.) . Illinois U.S.A.
- Stringfellow, D. A.** (2010). Certification and identification of embryos. In: Stringfellow D.A.; Givens, M. D. (eds) *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 4th edn. Champaign, IL: IETS, 2010.
- Stroud, B.; Hasler, J. F.** (2006). Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*, 65, 1: 65-76.
- Tachikawa, S.; Otoi, T.; Kondo, S.; Machida, T. and Kasai, M.** (1993). Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 34: 266-271.
- Takahashi et al.** (1982). citado por **Kanawaga, H.** (1993). *Bovine Embryo Transfer*. Published by Japan International Cooperation Agency (JICA). Second printing, 168.



- Teepker, G.; Keller, D. S.** (1989). Selection of sires originating from a nucleus breeding unit for use in a commercial dairy population. *Canadian Journal Animal Sciences*, 69: 595-604.
- Tervit, H. R.; Havik, P. G. and Smith J. F.** (1977). Egg transfer in cattle: Pregnancy rate following transfer to the uterine horn ipsilateral or contralateral to the functional corpus luteum. *Theriogenology*, 7: 3-10
- Thatcher, W. W.; Staples, C. R.; Danet-Desnoyers, G.; Oldick, B. and Schmitt, E. P.** (1994). Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 72: 16-30.
- Thatcher, W. W.; Moreira, F.; Santos, J. E. P.; Mattos, R. C.; Lopez, F. L.; Pancarci, S. M.; Risco, C. A.** (2001a). Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55: 75-90.
- Thatcher, W. W.; Guzeloglu, A.; Binelli, M.; Hansed, T. R.; Pru, J. K.** (2001b). Uterine conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, 56: 1435-1450.
- Thibier, M.** (2006). Transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. *IETS Newsletter*, 24: 12-18.
- Top 100 TPI International Bulls, Abril 2015.** [En línea]:[consulta: Septiembre 2015] http://www.holsteinusa.com/genetic_evaluations/bull_lists.html.
- Tríbulo, R.; Nigro, M.; Burry, E.; Caccia, M.; Tríbulo, H.; Bó, G. A.** (1997). Pregnancy rates in recipients receiving CIDR-B devices immediately following embryo transfer. *Theriogenology*, 47: 372.
- Tríbulo, H.; Bó G. A.; Gatti, G.; Tegli, J. C.; Cutaia, L.; Moreno, D.; Brito, M.; Tríbulo, R.** (2000). Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices to eliminate the need for estrus detection. *14th International Congress on Animal Reproduction*, Stockholm, Sweden, 2: 115.
- Tríbulo, H.; Moreno, D.; Cutaia, L.; Gatti, G.; Tríbulo, R.; Caccia, M.; Bó, G. A.** (2002). Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and eCG and transferred without estrus detection. *Theriogenology*, 57: 563.
- Twagiramungu, H.; Guilbault, L. A.; Dufour, J. J.** (1995). Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: A review. *J Anim Sci.*, 73: 3141-3151.
- Umbaugh, R. E.** (1949). Superovulation and ovum transfer in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 10: 295-305.
- Valencia, M. J. J.** (2009a). Evaluación y manipulación embrionaria en bovinos.- *Memoria del Curso teorico-practico sobre Transferencia de embriones en ganado bovino*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autonoma de México. Enero 29-31, 2009. México DF.
- Valencia, M. J. J.** (2009b). Criopreservación de embriones bovinos.- *Memoria del Curso teorico-practico sobre Transferencia de embriones en ganado bovino*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autonoma de México. Enero 29-31, 2009. México DF.



- Van Doormal, B.** (1991). To flush or not to flush. *Canadian Holstein*, 12: 7-9.
- Van Wagendonk-de Leeuw, A. M.; den Daas, J. H. G. and Rall, W. F.** (1994). Pregnancy rates in a comparative field trial of vitrification and one-step dilution or conventional slow freezing and three-step dilution of bovine embryos are similar. *Theriogenology*, 41: 326.
- Van Wagendonk-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.
- Vanroose, G.; Kruijff, A.; Van Soom, A.** (2000). Mortalidad embrionaria y las interacciones patógeno-embrión. *Reproducción Animal Ciencia*, 60: 131-143.
- Vasconcelos, J.; Sartori, R.; Oliveira, H.; Guenther, J.; Wilbank, M.** (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56: 307-314.
- Vasconcelos, J. L.; Demétrio, D. G.; Santos, R. M.; Chiari, J. R.; Rodrigues, C. A.; Sá Filho, O. G.** (2006). Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*, 65: 192-200.
- Viana, J. H. M.; Ferreira, A. M.; Sá, W. F.** (2000). Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesq Agrop Bras*, 35: 2501-2509.
- Vieira, L. M.; Rodrigues, C. A.; Mendanha, M. F.; Sá Filho, M. F.; Sales, J. N. S.; Souza, A.H.; Santos, J. E. P. and Baruselli, P. S.** (2014). Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle *Theriogenology* 82: 204-212
- Walker, A.; Kimura, K.; Michael, R.** (2009). Expression of bovine interferon-tau variants according to sex and age of conceptuses. *Theriogenology*, 72, 1: 44-53.
- Warthall, A. E.; Suttmöller P.** (2000). Potencial de la Transferencia de Embriones para controlar la transmisión de enfermedades. *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones*, 3ª edición, capítulo 2, 17-45
- Weems, C. W.; Weems, Y. S. and Randel, R. D.** (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet. J.*, 17: 206-228.
- Wehrman, M. E.; Fike, K. E.; Melvin, E. J.; Kojima, F. N.; Kinder, J. E.** (1997). Development of a persistent ovarian follicle and associated elevated concentrations of 17-estradiol preceding ovulation does not alter the pregnancy rate after embryo transfer in cattle. *Theriogenology*, 47: 1413-1421.
- Wenkoff, M.** (1986). The effect of Clenbuterol on pregnancy rates in bovine recipients after nonsurgical transfer. *Theriogenology*, 25: 214.
- Willet, E. L.; Black, W. G.; Casida, L. E.; Stone, W. I. I.; Buckner, P. J.** (1951). Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 113(2931):247.
- Wiltbank, J. N.; Zimmerman, D. R.; Ingalls, J. E.; Rowden, W. W.** (1965). Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. *J Anim Sci.*, 24: 990-994.



- Wolfenson, D.; Flamenbaum, I. and Berman A.** (1988). Hiperthermia and body energy store effects on estrous behavior, conception rate, and corpus luteum function in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 71: 3497-3504.
- Wolfenson, D.; Inbara, G.; Rotha, Z.** (2004). Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, v.62, p.1042-1055.
- Wollen, T.S.; Schultz, R.H.; Newkirk, H. L.** (1985). Use and handling of drugs and biologicals in embryo transfer. *Theriogenology*, 23: 31-43.
- Wright, J. M.** (1981). Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*, 15: 43-56.
- Wright, J. M.** (1985). Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology*, 23: 17-29.
- Zanenga, C. A.; Pedroso, M. S.; Lima. G. S.; Santos, I. C. C.** (2000). Embryo transfer without estrus observation. *Arq Fac Vet UFRGS*, Porto Alegre, Brazil, 28: 337.

IX.- ANEXOS

Anexo IX.1: Protocolos de trabajo y certificados



ABEREKIN, S.A.



Dpto. Trasplante de Embriones
Parque Tecnológico Edif. 600
48016 DERIO-VIZCAYA
Telf.: 629261834; 94-4541577; Fax: 94-4540878
E-MAIL: srfuentes@telefonica.net

PROTOCOLO DE SUPEROVULACIÓN Y SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS

GANADERO: OIAMAR

DÍA	DONANTE: VACA: <u>ESPH2000135821</u> F.NTº: 25/03/1989 F. PARTO: 29/09/1992 N° PARTO: 2 PROD: 28 L HOR.: PLUSET LOTE: 005 DOSIS: 16cc		RECEPTORAS	
	8 MAÑANA	8 TARDE	HORMONA: LOTE: DOSIS:	8 MAÑANA 8 TARDE
14-01-93	CELO		2cc Estrumate	
24-01-93	3cc Pluset	3cc Pluset		
25-01-93	2cc Pluset	2cc Pluset		
26-01-93	2cc Pluset +2cc Estrumate	2cc Pluset + 2cc Estrumate	2cc Estrumate	
27-01-93	1cc Pluset	1cc Pluset		
28-01-93	5cc Fertagyl	1ª IA	Vigilar celos	Vigilar celos
29-01-93	2ª IA		Vigilar celos	
04-02-93	RECOLECCIÓN N° 1993,007		TRANSFERENCIAS	

INSEMINACIONES: BLACKSTAR USAM1929410

OBSERVACIONES:

Disolver cada frasco pequeño con 10cc de disolvente y congelar todo lo que sobre.

Cualquier problema que surja avisar inmediatamente.

SANTIAGO FUENTES

Veterinario jefe Dpto. Trasplante de Embriones



ABEREKIN, S.A.



Dpto. Trasplante de Embriones
Parque Tecnológico Edif. 600
48016 DERIO-VIZCAYA
Telf.:629261834; 94-4541577; Fax: 94-4540878
E-MAIL: srfuentes@telefonica.net

PROTOCOLO DE SUPEROVULACIÓN Y SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS

GANADERO: MAS GENER

DÍA	DONANTE: NOVILLA: <u>ESPH1703654826</u> F.NTº: 23/03/2012 F. PARTO: N° PARTO PROD: HOR.: PLUSET LOTE: 1201032 DOSIS: 11cc		<u>RECEPTORAS</u> HORMONA: LOTE: DOSIS:	
	8 MAÑANA	8 TARDE	8 MAÑANA	8 TARDE
20-05-12	CIDR+ 2cc Estrumate		CIDR	
25-05-13		2cc Estrumate		
27-05-13	5cc Fertagil			
28-05-13		2,5cc Pluset		
29-05-13	2cc Pluset	1,5cc Pluset		
30-05-13	1cc Pluset	1cc Pluset	2cc Estrumate	
31-05-13	1cc Pluset	0,5cc Pluset		
01-06-13	0,5cc Pluset	0,5cc Pluset + 2cc Estrumate	Quitar CIDR	
02-06-13	0,5cc Pluset + 2cc Estrumate + quitar CIDR			
03-06-13	5cc Fertagil +	1ª IA	Celos + 5cc Fertagil	
04-06-13		2ª IA		
11-06-13	RECOLECCIÓN N° 2013,038		TRANSFERENCIAS	

INSEMINACIONES :

○ SEMEN: MOGUL; CANM03006972816

OBSERVACIONES:

Disolver cada frasco pequeño con 10cc de disolvente y congelar todo lo que sobre.

Cualquier problema que surja avisar inmediatamente

SANTIAGO FUENTES

Veterinario jefe Dpto. Trasplante de Embriones



ABEREKIN, S.A.



Dpto. Trasplante de Embriones
Parque Tecnológico Edif. 600
48016 DERIO-VIZCAYA
Telf.:629261834; 94-4541577; Fax: 94-4540878
E-MAIL: srfuentes@telefonica.net

PROTOCOLO DE SUPEROVULACIÓN Y SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS

GANADERO: MAS GENER

DÍA	DONANTE: NOVILLA: <u>ESPH1701633584</u> F.NTº: 21/06/1999 F. PARTO: Nº PARTO: PROD: HOR.: FOLLTROPIN LOTE:30VD030 DOSIS: 16cc		RECEPTORAS HORMONA: Foligón LOTE: DOSIS:	
	8 MAÑANA	8 TARDE	8 MAÑANA	8 TARDE
14-10-00	PRID		PRID	
15-10-00	5cc Progesterona E + 1cc Estilvo	NADA	5cc Progesterona E + 1cc Estilvo	
19-10-00	4cc Folltropin	3cc Folltropin	750 U.I. Foligón	
20-10-00	2,5cc Folltropin	2,5cc Folltropin		
21-10-00	1,5cc Folltropin +2cc Estrumate	1,5cc Folltropin + 2cc Estrumate + quitar Prid	2cc Estrumate	quitar Prid
22-10-00	0,5cc Folltropin	0,5cc Folltropin		
23-10-00	5cc Fertagil	1ª IA	5cc Fertagil	
24-10-00	2ª IA			
30-10-00	RECOLECCIÓN Nº 2000,137		TRANSFERENCIAS	

INSEMINACIONES:

○ SEMEN: MARSHALL; USAM0002297473

OBSERVACIONES:

Disolver cada frasco pequeño con 10cc de disolvente y congelar todo lo que sobre.

Cualquier problema que surja avisar inmediatamente

SANTIAGO FUENTES

Veterinario jefe Dpto. Trasplante de Embriones





ABEREKIN, S.A.

Dptº TRASPLANTE DE EMBRIONES
Parque Tecnológico edf. 600
48160 DERIO (Vizcaya)
TL: +34-629261834 / +34-944541577
srfuentes@telefonica.net



CERTIFICADO DE RECOLECCION Y CONGELACION DE EMBRIONES

Nº DE COLECTA.....:	2013,075	EMBRIONES TOTALES.....:	7
FECHA DE LA COLECTA.....:	19/11/2013	EMBRIONES TRANS. FRESCO.:	2
FECHA DE INSEMINACION.:	12/11/2013	EMBRIONES CONGELADOS.....:	4
GANADERO / COD. EXPL.....:	MAS GENER	ES171500006498	PROVINCIA..: GI

EQUIPO QUE REALIZO LA RECOLECCION: ABEREKIN, S.A.
ES15ET01B

PADRES GENETICOS

HEMBRA DONANTE:	RAZA:	HO	NRG:	ESPH1703245783	CROTAL-NOMBRE:	03825296
SEMEN UTILIZADO..:	RAZA:	HO	NRG:	USAM0070750485	NOMBRE.....:	TANGO

IDENTIFICACION DE LOS EMBRIONES

NCOL	DONA NRG	SEMEN	Nº	ED	CA	FC	CRIO	E/P	ZP	DIV	LAV	TRIP
▶ 2.013,075	ESPH1703245783	TANGO	1	6	1	C	ETGS	1	S	N	12	S
2.013,075	ESPH1703245783	TANGO	2	5	1	C	ETGS	1	S	N	12	S
2.013,075	ESPH1703245783	TANGO	3	5	1	C	ETGS	1	S	N	12	S
2.013,075	ESPH1703245783	TANGO	4	5	1	C	ETGS	1	S	N	12	S
2.013,075	ESPH1703245783	TANGO	5	5	1	F		1	S	N	12	S
2.013,075	ESPH1703245783	TANGO	6	5	1	F		1	S	N	12	S

Registro: 1 de 6

- 1.- Tiempo transcurrido de la recolección a la congelación: -2 horas.
- 2.- Envasado de los embriones: en pajuelas de 0,25cc.
- 3.- Etiquetado de los embriones: en pajuela identificadora de 0,5cc; con código de equipo; raza e identificación de la donante y semen; fecha de congelación; nº del embrión, estado de desarrollo y calidad del embrión, según códigos de la Sociedad Internacional de Trasplante de Embriones (I.E.T.S.)
- 4.- Crioprotector utilizado: Etilenglicol 1,5M + Sacarosa 0,1M (ETGS).
- 5.- Curva de congelación: Seeding= -7°C; descenso de temperatura a 0,5°C/mi.; inmersión en N2L a -35°C.
- 6.- Descongelación: Etilenglicol 1.5M + Sacarosa 0.1M (ETGS)= 10" al aire + 20" en H2O a 27°C + transferencia directa.

7.- EL ABAJO FIRMANTE, RESPONSABLE VETERINARIO DEL EQUIPO DE TRASPLANTE DE EMBRIONES CON NUMERO HOMOLOGADO POR LA EEC: ES15ET01B, DECLARO QUE LOS EMBRIONES ARRIBA MENCIONADOS, HAN SIDO PRODUCIDOS, RECOLECTADOS Y ALMACENADOS DE ACUERDO A LA DIRECTIVA 89/556/CEE; RD 855/1992; RD 841/2011.

**ABEREKIN, S.A.**

Dptº TRASPLANTE DE EMBRIONES
Parque Tecnológico edf. 600; 48160 DERIO (Vizcaya)
TL: +34-629261834 / +34-944541577; Fax: +34-944540878
arfuentes@telefonica.net

CERTIFICADO DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES**DATOS DE LA RECOLECCION**

FECHA RECOLECCION.....:	16/06/2005	Nº DE RECOLECCION.....:	2.005,073
GANADERO / COD. EXP...:	MAS GENER	ES171500006498	PRO GI
EQUIPO QUE REALIZO LA RECOLECCION: ABEREKIN, S.A.			E0101

PADRES GENETICOS

HEMERA DONANTE	RAZA	HO	Nº REGISTRO	ESPH1702142206	CROTAL:	02439999
SEMEN UTILIZADO:	RAZA	HO	Nº REGISTRO	ESPM9201683779	NOMBR	DUPLEX

TRANSFERENCIA DE LOS EMBRIONES

FECHA TRANSFERENCIA.:	16/06/2005										
GANADERO / COD. EXP...:	MAS GENER	ES171500006498	PRO	GI							
DATOS DE LAS RECEPTORAS				EMBRIONES							
RECEPTORA	Nº CUADR	RZ	FECHA DE CELO	Nº E	ED	CA	FC	CRIOPI	CPC	OBSERVACIONES	
1123	624	HO	09/06/2005	6	4	2	F				
1125	626	HO	09/06/2005	7	4	2	F				
0569	619	HO	09/06/2005	8	4	2	F				

VETERINARIO QUE REALIZA LA TRANSFERENCIA: **SANTIAGO FUENTES; N° COL. VI-237**

Anexo IX.2: Fichas de registro de prospectos



RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO VETERINARIO

PLUSET polvo y disolvente para solución inyectable

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Un vial de producto liofilizado contiene:

Sustancias activas:

- Hormona folículo-estimulante (FSHp) 500 UI
- Hormona luteinizante (LHp) 500 UI

Un vial de disolvente contiene:

- Clorocresol 0,021 g
- Solución fisiológica salina, estéril y apirógena c.s.p. 21 ml

Cada ml de solución reconstituida contiene:

Sustancias activas:

- Hormona folículo-estimulante (FSHp) 50 UI
- Hormona luteinizante (LHp) 50 UI

Excipientes:

- Clorocresol 1 mg
- Solución fisiológica salina, estéril y apirógena c.s.p 1 ml

Para la lista completa de excipientes, véase la sección 6.1.

3. FORMA FARMACÉUTICA

Polvo y disolvente para solución inyectable.

Polvo liofilizado blanco o casi blanco y solución transparente e incolora

4. DATOS CLÍNICOS:

4.1 Especies de destino

Bovinos (hembras reproductivamente maduras)

4.2 Indicaciones de uso, especificando las especies de destino:

Inducción de la superovulación en terneras reproductivamente maduras o vacas.

4.3 Contraindicaciones

Ver sección 4.7

4.4 . Advertencias especiales para cada especie de destino

No procede

4.5 Precauciones especiales de uso

Precauciones especiales para su uso en animales

Se aconseja seguir las siguientes recomendaciones con el fin de obtener una respuesta adecuada en la inducción de la superovulación:

- a) El animal debe haber tenido al menos un ciclo estral normal antes de la iniciación del tratamiento con PLUSET.
- b) Al iniciar el tratamiento con PLUSET el animal no debe presentar signos clínicos de enfermedad. El examen ovárico debe confirmar la presencia de un cuerpo lúteo funcional y la ausencia de cualquier condición patológica tales como degeneración quística ovárica o adhesiones alrededor de los ovarios.
- c) Es conveniente iniciar el tratamiento entre los días 9 y 12 del ciclo estral (siendo el más idóneo el día 11).
- d) A las 60 y/o 72h del inicio del tratamiento superovulatorio, debe administrarse por vía intramuscular una dosis luteolítica de prostaglandina F₂ alfa o análogo.
- e) El celo tendrá lugar a las 40-48h de la aplicación de la prostaglandina, y los animales deben inseminarse a las 12h del inicio del celo y de nuevo 12h más tarde con semen de alta calidad.
- f) Tras la recolecta de los embriones a los 7 días, se recomienda administrar a las donantes otra dosis de prostaglandina que asegure un rápido retorno al celo; si no, se deben examinar los animales tras unas 4 semanas, para comprobar que se ha restaurado la actividad ovárica. La inseminación puede llevarse a cabo durante el primer celo tras la superovulación, que se da normalmente tras un periodo de 28 días.
- g) No ha sido evaluado el efecto del tratamiento con PLUSET por largos periodos de tiempo. Por ello se recomienda no administrar PLUSET más de dos tratamientos superovulatorios, y dejar transcurrir al menos un ciclo estral natural entre ambos tratamientos.
- h) El intervalo entre el parto y el inicio del tratamiento de superovulación debe ser de al menos 3 meses.
- i) Pueden darse variaciones individuales en la respuesta, según edad, raza o estatus reproductivo.

Precauciones específicas que debe tomar la persona que administre el medicamento a los animales

Deben tomarse precauciones al manipular el producto para evitar una auto-inyección. Una auto-inyección accidental puede provocar efectos biológicos en mujeres y en el feto. En caso de inyección accidental en mujeres gestantes, o posiblemente gestantes, consultar al médico.

4.6 Reacciones adversas (frecuencia y gravedad)

Ligera disminución de la producción láctea.

Tras el tratamiento es posible que se retrase la aparición del celo.

Pueden formarse quistes ováricos como resultado de la inducción de la superovulación.

4.7 Uso durante la gestación y la lactancia

No administrar a vacas gestantes.

Durante la superovulación se observa una ligera disminución en la producción de leche, si bien ésta alcanza, por lo general, los niveles previos al tratamiento al cabo de 2 semanas.

4.8. Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

Ninguna conocida.

4.9. Posología y vía de administración

Disolver cada vial de liofilizado con 10,5 ml de disolvente.

Trabajar en condiciones asépticas durante la reconstitución y al extraer las alícuotas del vial.

Limpiar y desinfectar adecuadamente el tapón del vial antes de introducir la aguja estéril.

Agitar suavemente durante la reconstitución.

PLUSET debe administrarse únicamente por vía intramuscular.

Se recomienda el siguiente protocolo para la inducción de la superovulación en la vaca:

La dosis total recomendada es de 800 a 1000 UI en dosis decrecientes durante 4 a 5 días.

Considerando la variabilidad entre animales y tomando en cuenta la raza, edad y estatus reproductivo, la dosis debe ajustarse convenientemente. Para novillas y vacas de carne se recomienda una dosis total de 800 UI. Para vacas lecheras la dosis puede incrementarse hasta

1000 UI teniendo en cuenta la edad, el número de partos y la producción láctea.

Protocolo recomendado para 800 UI en 4 días:

Día 1*	08:00 hrs	3.0 ml i.m.	(150 UI FSH+ 150 UI LH)
	20:00 hrs	3.0 ml i.m.	(150 UI FSH+ 150 UI LH)
Día 2	08:00 hrs	2.5 ml i.m.	(125 UI FSH+ 125 UI LH)
	20:00 hrs	2.5 ml i.m.	(125 UI FSH+ 125 UI LH)
Día 3**	08:00 hrs	1.5 ml i.m.	(75 UI FSH + 75 UI LH)
	20:00 hrs	1.5 ml i.m.	(75 UI FSH + 75 UI LH)
Día 4	08:00 hrs	1.0 ml i.m.	(50 UI FSH + 50 UI LH)
	20:00 hrs	1.0 ml i.m.	(50 UI FSH + 50 UI LH)

Protocolo recomendado para 1000 UI en 5 días:

Día 1*	08:00 hrs	3.0 ml i.m.	(150 UI FSH+ 150 UI LH)
	20:00 hrs	3.0 ml i.m.	(150 UI FSH+ 150 UI LH)
Día 2	08:00 hrs	2.5 ml i.m.	(125 UI FSH+ 125 UI LH)
	20:00 hrs	2.5 ml i.m.	(125 UI FSH+ 125 UI LH)
Día 3**	08:00 hrs	2.0 ml i.m.	(100 UI FSH+ 100 UI LH)
	20:00 hrs	2.0 ml i.m.	(100 UI FSH+ 100 UI LH)
Día 4	08:00 hrs	1.5 ml i.m.	(75 UI FSH + 75 UI LH)
	20:00 hrs	1.5 ml i.m.	(75 UI FSH + 75 UI LH)
Día 5	08:00 hrs	1.0 ml i.m.	(50 UI FSH + 50 UI LH)
	20:00 hrs	1.0 ml i.m.	(50 UI FSH + 50 UI LH)

* corresponde al día 11 del ciclo estral.

**A las 60 y/o 72h del inicio del tratamiento superovulatorio, debe administrarse por vía intramuscular una dosis luteolítica de prostaglandina F₂ alfa.

4.10 Sobredosificación (síntomas, medidas de urgencia, antídotos), en caso necesario

Se aconseja no sobrepasar la dosis máxima recomendada. Altas dosis de FSH y LH pueden asociarse con tasas de fertilización reducidas, resultando en un incremento de embriones sin fertilizar.

4. 11 Tiempo de espera

Vacas: carne: cero días
 leche: cero horas

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Grupo farmacoterapéutico: Gonadotropinas
Código ATC Vet: QG03GA

5.1 Propiedades farmacodinámicas

FSH y LH porcinas son glicoproteínas secretadas por la hipófisis anterior bajo la influencia de la GnRH liberada del hipotálamo. Estas proteínas se componen de una subunidad alfa y otra beta. La especificidad biológica reside en la unidad beta (peso molecular = 27,000 - 34,000).

FSH y LH estimulan la función gonadal y la secreción de hormonas sexuales en mamíferos macho o hembra.

En las hembras, durante el ciclo estral normal la FSH estimula el desarrollo y maduración de los folículos de Graff y el óvulo. Los folículos responden con un aumento de secreción de estrógenos por parte de las células tecales internas alrededor del folículo, el cual a mitad del ciclo, estimula la liberación de LH hipofisaria por un mecanismo de retroalimentación. La secreción aumentada de estrógenos y LH por parte de la hipófisis causa la rotura del folículo provocando la ovulación. Después el folículo se transforma en cuerpo lúteo secretor de progesterona.

Es posible aumentar la tasa de ovulación administrando preparados de gonadotropinas exógenas con FSH y LH. Se supone que la administración de gonadotropinas exógenas aumenta el número de folículos antrales y reduce el número de folículos atréticos. Una proporción adecuada FSH/LH y un régimen de tratamiento adecuados son esenciales para una respuesta ovárica efectiva al tratamiento de la superovulación. Mientras la FSH estimula el crecimiento folicular, es necesario un mínimo aporte de LH para obtener ovulaciones múltiples. Aunque la tasa de bioactividad FSH/LH del PLUSET se mantiene 1:1, su actividad principal es la de estimular el folículo, debido a la corta vida media de la LH porcina.

5.2. Datos farmacocinéticos

Las gonadotropinas FSH y LH presentan estructuras moleculares comparables en todas las especies de mamíferos, con sólo pequeñas diferencias estructurales. En consecuencia, FSH y LH naturales de origen porcino, serán metabolizadas y excretadas como las respectivas gonadotropinas endógenas.

FSH y LH, tanto endógenas como exógenas, se eliminan mayoritariamente del organismo a través de los riñones. Las hormonas glicoproteicas inyectadas se absorben por filtración glomerular, seguida por (a) excreción en la orina o bien por (b) degradación por las células del túbulo proximal. La hormona proteínica filtrada es reabsorbida (internalizada vía endocitosis) y

catabolizada a oligopéptidos y aminoácidos libres en los lisosomas. Los aminoácidos liberados son luego devueltos al torrente sanguíneo vía circulación peritubular.

La cinética de pFSH y pLH en vacas se representa por una curva bioexponencial con un tiempo inicial de eliminación rápido ($t_{1/2 \alpha}$) seguido de una disminución lenta ($t_{1/2 \beta}$) en la sangre.

Los valores de vida media de FSH son de 2 ½ h ($t_{1/2 \alpha}$) y de 25 ½ h ($t_{1/2 \beta}$) respectivamente, determinados tras una sola inyección i.v en dos novillas. Estos valores para la LH son de 40 min y 6 h respectivamente.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1 Lista de excipientes

Clorocresol
Cloruro sódico
Agua para preparaciones inyectables

6.2 Incompatibilidades

No se han descrito

6.3 Período de validez

Período de validez del medicamento veterinario acondicionado para su venta: 2 años
Período de validez después de su reconstitución según las instrucciones: seis días

6.4 Precauciones especiales de conservación

Conservar a temperatura inferior a 25 °C.
Solución reconstituida: almacenar y transportar refrigerada (+2°C a +8°C) y no congelar.
Conservar el vial en el embalaje exterior

6.5 Naturaleza y composición del envase primario:

Vial para el producto liofilizado:

- Vial de vidrio incoloro neutro (tipo 1). Capacidad: 10 ml. Provisto de tapón de bromobutilo y silicato y sellado con cápsula precinto de aluminio con anillo de apertura flip-off.

Vial para el disolvente:

- Vial de vidrio incoloro neutro (tipo 1). Capacidad: 21 ml. Con tapón de caucho de color gris y cápsula precinto de aluminio con anillo de apertura flip-off.

Caja de cartón con dos viales de vidrio de 10 ml de producto liofilizado y un vial de vidrio de 21 ml de disolvente.

6.6 Precauciones especiales para la eliminación del medicamento veterinario no utilizado o, en su caso, los residuos derivados de su uso

Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con las normativas locales.

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

Laboratorios Calier, S.A.
Barcelonès, 26 (Pla del Ramassà)
Les Franqueses del Valles (Barcelona)
ESPAÑA

8. NÚMERO(S) DE AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

1.559 ESP

9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN O DE LA RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN

24 de marzo de 2004

10 .FECHA DE REVISIÓN DEL TEXTO

26 de mayo de 2009

PROHIBICIÓN DE VENTA, DISPENSACIÓN Y/O USO

Medicamento sujeto a prescripción veterinaria.
Administración exclusiva por el veterinario.



RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO VETERINARIO

FOLLTROPIN 700 UI POLVO Y DISOLVENTE PARA SOLUCION INYECTABLE

AT: Folltropin 700 UI polvo y disolvente para solución inyectable para ganado bovino

FI: Folltropin vet 700 UI polvo y disolvente para solución inyectable

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

El vial de polvo contiene:

Sustancia activa:

Hormona foliculoestimulante (FSH) 700 UI*

*(determinadas por el Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos en 1986)

El vial de disolvente contiene:

Excipientes

Alcohol bencílico 360 mg

1 ml de solución reconstituida contiene:

Sustancia activa:

Hormona foliculoestimulante (FSH) 35 UI

Excipientes

Alcohol bencílico 18 mg

Para la lista completa de excipientes, véase la sección 6.1.

3. FORMA FARMACÉUTICA

Polvo y disolvente para solución inyectable

Polvo: polvo blanco liofilizado

Disolvente: solución incolora transparente

Solución reconstituida: solución rosada transparente.

4. DATOS CLÍNICOS

4.1 Especies de destino

Bovino (hembras aptas para la reproducción).

4.2 Indicaciones de uso, especificando las especies de destino

Para inducir la superovulación de vacas y vaquillas aptas para la reproducción.

4.3 Contraindicaciones

No usar en caso de hipersensibilidad a la sustancia activa.

No usar en machos ni hembras bovinas no aptas para la reproducción.
No usar en hembras preñadas.

4.4 Advertencias especiales para cada especie de destino

Ninguna.

4.5 Precauciones especiales de uso

Precauciones especiales para su uso en animales

El medicamento solo debe administrarse a vacas clínicamente sanas con ciclo menstrual normal. La respuesta a la superovulación varía mucho de unos animales a otros. Puede existir una pequeña proporción de animales sin respuesta en cualquier grupo tratado.

Precauciones específicas que debe tomar la persona que administre el medicamento veterinario a los animales

El medicamento debe manipularse con precaución para evitar la autoinyección. Una autoinyección accidental de FSH puede provocar efectos biológicos en mujeres y fetos. En caso de autoinyección accidental en mujeres embarazadas o en estado gestacional desconocido, consulte con un médico inmediatamente y muéstrele el prospecto o la etiqueta.

4.6 Reacciones adversas (frecuencia y gravedad)

Tras la administración del medicamento durante tres ciclos de superovulación, algunas vacas han presentado quistes ováricos que no impidieron la preñez.
Después de la superovulación, existe la posibilidad de que se retrase el celo.

4.7 Uso durante la gestación, la lactancia o la puesta

Estudios de laboratorio con FSH en ratas y conejas han puesto de manifiesto la existencia de embriotoxicidad/fetotoxicidad. La toxicidad del producto no se ha evaluado en vacas preñadas. No administrar a vacas preñadas.

4.8 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

Ninguna conocida.

4.9 Posología y vía de administración

Solo para administración por vía intramuscular.

Reconstituir el polvo Folltropin con el disolvente Folltropin. Tanto para la reconstitución como para la extracción del medicamento deberá emplearse una técnica aséptica estricta.

Pauta posológica:

Comenzar a aplicar las inyecciones entre el octavo y el décimo día del período de celo observado o inducido. Administrar 2,5 ml (87,5 UI) de Folltropin por vía intramuscular dos veces al día durante 4 días. Junto con la sexta dosis de Folltropin, administrar prostaglandina F2 α o

un análogo de la prostaglandina F2 α , en la dosis recomendada por su fabricante, para provocar luteólisis.

Inseminar a los animales entre 12 y 24 horas después del inicio de la luteólisis o entre 60 y 72 horas después del tratamiento con prostaglandina. Si está indicado, podrán realizarse inseminaciones adicionales a intervalos de 12 horas.

4.10 Sobredosificación (síntomas, medidas de urgencia, antídotos), en caso necesario

Las vacas respondieron al medicamento de manera uniforme durante una serie de 3 tratamientos. No se observaron reacciones adversas en las vacas tratadas después de la inyección de 400 mg de Folltropin en dosis única.

4.11 Tiempo(s) de espera

Carne y vísceras: Cero días

Leche: Cero horas

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Hormona foliculoestimulante obtenida por selección de glándulas pituitarias porcinas para uso en ganado bovino.

Grupo farmacoterapéutico: Hormonas sexuales y moduladores del aparato genital, gonadotropinas.

Código ATCvet: QG03GA90

5.1 Propiedades farmacodinámicas

La FSH es un iniciador de la actividad ovárica, ya que promueve directamente el crecimiento de los folículos ováricos. La administración de FSH exógena a mamíferos en el momento de aparición de la ola folicular estimula el crecimiento de todos los folículos de más de 1,7 mm de diámetro que normalmente terminarían en atresia durante cada ciclo de celo. Múltiples folículos en crecimiento requieren estimulación de FSH hasta alcanzar una madurez suficiente para responder a LH en las fases finales de maduración y ovulación. Este proceso dura aproximadamente 4 días. En el ganado bovino, los óvulos fecundados producidos mediante superovulación con FSH, PMSG y otros agentes farmacológicos que contienen altas concentraciones de LH han demostrado una menor fertilización.

Folltropin contiene extracto de glándulas pituitarias porcinas con actividad FSH y baja actividad LH.

5.2 Datos farmacocinéticos

Administrada mediante inyección intramuscular, la FSH de origen porcino es absorbida rápidamente desde el lugar de la inyección. Tiene una semivida de 5 horas y es indetectable en el flujo sanguíneo 12 horas después de la inyección. La FSH es inactivada por el hígado y excretada por los riñones.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1 Lista de excipientes

Polvo liofilizado

Ninguno

Disolvente

Agua para preparaciones inyectables

Cloruro de sodio

Alcohol bencílico

Hidróxido de sodio (para ajuste del pH)

Ácido clorhídrico (para ajuste del pH)

6.2 Incompatibilidades

No mezclar con ningún otro medicamento veterinario excepto el disolvente u otro componente suministrado para su uso con el medicamento veterinario

6.3 Período de validez

Período de validez del medicamento veterinario acondicionado para su venta: viales de polvo liofilizado y disolvente: 4 años.

Período de validez después de su reconstitución según las instrucciones: 4 días

6.4. Precauciones especiales de conservación

Viales de polvo liofilizado y disolvente: No conservar a temperatura superior a 25°C

Solución reconstituida: Conservar en nevera (entre 2°C y 8°C).

Guardar los viales en el embalaje exterior con objeto de protegerlos de la luz.

6.5 Naturaleza y composición del envase primario

Caja de cartón que contiene un vial de polvo y un vial de disolvente.

Polvo liofilizado

Vial de vidrio transparente de 20 ml (tipo I) con tapón de caucho halobutilo (tipo I) y cápsula de aluminio roja.

Disolvente

Vial de vidrio transparente de 20 ml (tipo I) con tapón de caucho halobutilo (tipo I) y cápsula de aluminio amarilla.

6.6 Precauciones especiales para la eliminación del medicamento veterinario no utilizado o, en su caso, los residuos derivados de su uso

Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con las normativas locales

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

Bioniche Animal Health Europe Ltd.
Bracetown Business Park
Clonee
Dublín 15
Irlanda

8. NÚMERO(S) DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

1604 ESP

9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN/RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN

07 de diciembre de 2004

10. FECHA DE LA REVISIÓN DEL TEXTO

25 de julio de 2013

PROHIBICIÓN DE VENTA, DISPENSACIÓN Y/O USO

No procede



RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO VETERINARIO

PRID DELTA 1,55 g SISTEMA DE LIBERACIÓN VAGINAL PARA BOVINO

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Cada sistema de liberación contiene:

Sustancia activa:

1,55 g de progesterona

Excipientes:

Para la lista completa de excipientes, véase la sección 6.1.

3. FORMA FARMACÉUTICA

Sistema de liberación vaginal.

Dispositivo triangular blanquecino con un cordón doble de 50 cm anudado.

4. DATOS CLÍNICOS

4.1 Especies de destino

Bovino: vacas y novillas.

4.2 Indicaciones de uso, especificando las especies de destino

Para el control del ciclo estral en vacas y novillas incluyendo:

- Sincronización del celo en hembras cíclicas. Para ser usado en combinación con una prostaglandina (PGF_{2α}).
- Inducción y sincronización del celo en hembras no cíclicas. Para ser usado en combinación con una prostaglandina y gonadotropina coriónica equina (eCG, anteriormente PMSG).

4.3 Contraindicaciones

No utilizar en novillas sexualmente inmaduras o en hembras con tracto genital anómalo, por ejemplo freemartins.

No utilizar antes de que hayan pasado 35 días desde la fecha del parto anterior.

No utilizar en animales que presenten infección o enfermedad no-infecciosa del tracto genital.

No utilizar en hembras gestantes. Véase la sección 4.7.

4.4 Advertencias especiales para cada especie de destino

El porcentaje de vacas que muestran estro dentro de un periodo dado después del tratamiento es por lo general mayor que en las vacas no tratadas y la fase lútea posterior es de duración

normal. No obstante, el tratamiento sólo con progesterona, en base al régimen de dosificación propuesto, no es suficiente para inducir el celo y la ovulación en todas las hembras cíclicas. Con objeto de optimizar el protocolo, es aconsejable determinar la actividad ovárica cíclica antes de usar el tratamiento con progesterona.

Los animales que se encuentren en malas condiciones, ya sea por enfermedad, alimentación inadecuada, sometidos a estrés innecesario u otros factores, pueden responder mal al tratamiento.

4.5 Precauciones especiales de uso

Precauciones especiales para su uso en animales

Se recomienda esperar un mínimo de 35 días después del parto antes de iniciar el tratamiento con este medicamento.

Precauciones específicas que debe tomar la persona que administre el medicamento a los animales

Se debe usar guantes cuando se manipula el medicamento tanto durante la inserción como en la extracción.

No comer ni beber mientras se manipula el medicamento.

Lavar las manos después de su manipulación.

4.6 Reacciones adversas (frecuencia y gravedad)

Durante los siete días de tratamiento, el dispositivo puede inducir una reacción local suave (es decir inflamación de la pared vaginal). En un estudio clínico llevado a cabo con 319 vacas y novillas se ha demostrado que 25% de los animales presentaron secreciones vulvares turbias o viscosas en el momento de la retirada del dispositivo. Esta reacción local desaparece rápidamente sin ningún tratamiento entre la retirada y la inseminación y no afecta a la fertilidad en la inseminación ni a las tasas de gestación.

4.7 Uso durante la gestación, la lactancia o la puesta

Puede utilizarse durante la lactación.

No utilizar antes de que hayan pasado 35 días desde el parto anterior.

Estudios de laboratorio en ratas y conejos, tras administración de dosis elevadas y repetidas de progesterona, por vía intramuscular o subcutánea, han evidenciado efectos tóxicos para el feto. El uso del medicamento está contraindicado en hembras gestantes.

4.8 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

Ninguna conocida.

4.9 Posología y vía de administración

Uso vaginal.

1.55g de progesterona/animal durante 7 días.

Con la ayuda de un aplicador, insertar un dispositivo en la vagina del animal. El dispositivo intravaginal deberá permanecer colocado durante 7 días.

En hembras cíclicas, el dispositivo debe ser utilizado en combinación con una prostaglandina, inyectada 24 horas antes de extraer el dispositivo.

En hembras no cíclicas, debe administrarse una inyección de prostaglandina 24 horas antes de extraer el dispositivo y una inyección de eCG en el momento de la extracción.

Procedimiento de desinfección:

El aplicador debe limpiarse y desinfectarse con una solución antiséptica no irritante antes y después de su uso y entre cada animal.

Utilización del aplicador e Inserción:

Doble el dispositivo antes de insertarlo en el aplicador. Asegúrese de que el cordón se sitúa en el lugar adecuado

Lubrique ligeramente el extremo distal del aplicador con un lubricante obstétrico.

Limpie la vulva del animal antes de insertar con delicadeza el aplicador en la vagina.

Cuando el aplicador alcance el fondo de la vagina pulse en el mango para liberar el dispositivo.

Retire el aplicador suavemente y asegúrese que el cordón del dispositivo esté fuera de la vulva.

En caso necesario, según el tamaño del animal, corte un poco el cordón.

Retirada:

Siete días después de su colocación, retire el dispositivo tirando suavemente del cordón.

Inseminación:

Los animales deben ser inseminados 56 horas después de la retirada del dispositivo.

El dispositivo está destinado a un único uso.

4.10 Sobredosificación (síntomas, medidas de urgencia, antídotos)

No procede.

4.11 Tiempo de espera

Carne: cero días

Leche: cero días

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Grupo farmacoterapéutico: hormona sexual (progestágeno).

Código ATCvet: QG03DA04

5.1 Propiedades farmacodinámicas

La progesterona interacciona con receptores intranucleares específicos y se une a la secuencia específica de ADN en el genoma e inicia la transcripción de un conjunto específico de genes, el cual es el último responsable de la traducción de la acción hormonal en eventos fisiológicos. La progesterona tiene una acción de retroalimentación negativo en el eje hipotálamo-pituitaria, sobretodo en la secreción de GnRH y en consecuencia, de LH. La progesterona previene las oleadas hormonales de la hipófisis (FSH y LH) y así suprime el celo y la ovulación. Cuando se retira, la progesterona disminuye drásticamente en 1 hora permitiendo la maduración folicular, el celo y la ovulación en un estrecho margen.

5.2 Propiedades farmacocinéticas



La progesterona se absorbe rápidamente por vía intravaginal. La progesterona circulante se une a las proteínas plasmáticas. La progesterona se une a la globulina fijadora de corticosteroides (CBG) y a la albúmina. La progesterona se acumula en el tejido graso debido a sus propiedades lipófilas, y en tejidos/órganos que contengan receptores de progesterona. El hígado es el lugar principal del metabolismo de la progesterona. La progesterona tiene una vida media de 3 horas, una Cmax de 5 µg/L y una Tmax de 9h. Se excreta principalmente por heces y secundariamente por la orina.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1 Lista de excipientes

Etilvinilacetato
Poliamida
Cordón de poliéster

6.2. Incompatibilidades

Ninguna conocida.

6.3 Periodo de validez

Periodo de validez del medicamento veterinario acondicionado para su venta: 3 años.
Periodo de validez después de abierto el sobre: 6 meses.

6.4 Precauciones especiales de conservación

Este medicamento veterinario no requiere condiciones especiales de conservación.

6.5 Naturaleza y composición del envase primario

Material de acondicionado primario

Sobre de poliéster/polietileno triangular o rectangular.

Formatos:

Caja de cartón conteniendo 10 sobres con 1 dispositivo
Caja de cartón conteniendo 25 sobres con 1 dispositivo
Caja de cartón conteniendo 1 aplicador y 25 sobres con 1 dispositivo
Caja de cartón conteniendo 50 sobres con 1 dispositivo
Caja de cartón conteniendo 1 aplicador y 50 sobres con 1 dispositivo
Caja de cartón conteniendo 100 sobres con 1 dispositivo.
Caja de polietileno conteniendo 50 sobres con 1 dispositivo
Caja de polietileno conteniendo 1 aplicador y 50 sobres con 1 dispositivo
Sobre conteniendo 10 dispositivos

Es posible que no se comercialicen todos los formatos.



6.6 Precauciones especiales para la eliminación del medicamento veterinario no utilizado o, en su caso, los residuos derivados de su uso

Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con las normativas locales.

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

CEVA SALUD ANIMAL, S.A.
C/Carabela La Niña 12
08017 – Barcelona

8. NÚMERO DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

2194 ESP

9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN O DE LA RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN

Fecha de la primera autorización: 30 de septiembre de 2010

Fecha de la renovación: 16 de junio de 2015

10. FECHA DE REVISIÓN DEL TEXTO

Julio de 2015

PROHIBICIÓN DE VENTA, DISPENSACIÓN Y/O USO

Uso veterinario. Medicamento sujeto a prescripción veterinaria.



RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO VETERINARIO

CIDR 1,38 g DISPOSITIVO VAGINAL PARA VACAS

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Sustancia(s) activa(s):

Cada dispositivo contiene 1,38 g de Progesterona.

Para la lista completa de excipientes, véase la sección 6.1

3. FORMA FARMACÉUTICA

Sistema de liberación vaginal.

Dispositivo en forma de T que contiene un revestimiento moldeado de elastómero de silicona impregnado de progesterona sobre una espina inerte de nylon.

4. DATOS CLÍNICOS

4.1 Especies de destino

Bovino (vacas y novillas)

4.2 Indicaciones de uso, especificando las especies de destino

Para el control del ciclo del estro en vacas y novillas cíclicas, incluyendo:

- Sincronización del estro en grupos de animales.
- Sincronización de animales donantes y receptores para el transplante de embriones.

Para utilizar en combinación con prostaglandina F2 α o análogos.

Si se usa como se recomienda, normalmente el estro aparece a las 48-96 horas de la extracción del dispositivo, mostrando la mayoría de los animales el estro a las 48-72 horas.

Para inducción y sincronización del estro en protocolos de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF):

- En vacas y novillas cíclicas. Para ser utilizado en combinación con Prostaglandina F2 α (PG F2 α) o análogo.
- En vacas y novillas cíclicas y no cíclicas. Para ser utilizado en combinación con la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o análogo y PG F2 α o análogo.
- En vacas no cíclicas. Para ser utilizado en combinación con PG F2 α o análogo y gonadotropina coriónica equina (CGe).

4.3 Contraindicaciones

No utilizar:

- en vacas o novillas con tracto genital anómalo o inmaduro, o con infecciones genitales.

- en hembras gestantes.
- en los 35 días siguientes al parto.

4.4 Advertencias especiales

El tratamiento de progesterona por si solo, según el régimen de dosis propuesto, no es suficiente para inducir el estro y la ovulación en todas las hembras cíclicas. Los protocolos de cría basados en progesterona son las herramientas de gestión de la reproducción y no deben sustituir a una alimentación adecuada y a la gestión de la salud en general. La elección de un protocolo específico debe basarse en los requisitos del rebaño individual y es aconsejable examinar la actividad cíclica del ovario antes de usar el tratamiento de progesterona.

La respuesta de vacas y novillas a protocolos de sincronización basados en progesterona está influenciada por el estado fisiológico en el momento del tratamiento.

Las respuestas al tratamiento pueden variar entre los rebaños o entre vacas en un rebaño.

Sin embargo, el porcentaje de vacas que muestran estro dentro de un periodo dado es por lo general mayor que en las vacas no tratadas y la fase lútea posterior es de duración normal.

4.5 Precauciones especiales de uso

Precauciones especiales para su uso en animales

Los animales con mala condición corporal ya sea por enfermedad, nutrición inadecuada u otros factores, pueden responder de manera pobre al tratamiento.

Precauciones especiales que debe tomar la persona que administre el medicamento a los animales

Usar un equipo de protección personal consistente en guantes al manipular el medicamento veterinario, durante la inserción y la extracción. Inserte el dispositivo utilizando el aplicador.

Lávese las manos y la piel expuesta con agua y jabón después de su uso.

No beba, coma o fume mientras manipule el medicamento veterinario

4.6 Reacciones adversas (frecuencia y gravedad)

Se ha observado descarga vaginal asociada con irritación local al retirar el dispositivo. Esta descarga se limpia generalmente entre el momento de la extracción y la inseminación. No se ha observado que se afecten las tasas de concepción después del tratamiento.

4.7 Uso durante la gestación, la lactancia o la puesta

Puede utilizarse durante la lactación.

No ha quedado demostrada la seguridad del medicamento veterinario por lo tanto, no usar en animales gestantes o en los 35 días siguientes al parto. Los estudios de laboratorio efectuados en ratas y conejos, tras administración intramuscular o subcutánea de altas y repetidas dosis de progesterona, han demostrado evidencias de efectos fetotóxicos.

4.8 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

Ninguna conocida

4.9 Posología y vía de administración

1,38g de progesterona (1 dispositivo) por animal durante 7-9 días (dependiendo de la indicación).

Para la sincronización del estro y la sincronización de animales donantes y receptores para el trasplante de embriones

Se debe insertar un dispositivo en la vagina de cada vaca o novilla que vaya a ser tratada. El dispositivo debería permanecer colocado en posición durante 7 días con una inyección de una dosis luteolítica de prostaglandina F2 α , o de un análogo, administrada 24 horas antes de la extracción. En los animales que respondan al tratamiento el estro se producirá generalmente entre 1-3 días después de retirar el dispositivo. Las vacas deberán inseminarse en las 12 horas siguientes al primer celo observado.

Para inducción y sincronización del estro en protocolos de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF):

Los siguientes protocolos de IATF se han observado con frecuencia en la literatura científica y se deben utilizar:

En vacas y novillas cíclicas:

- Introducir un CIDR 1,38 g dentro de la vagina durante 7 días
- Inyectar una dosis luteolítica de PGF2 α o análogo 24 horas antes de la eliminación del dispositivo.
- IATF 56 horas después de la eliminación del dispositivo.

En vacas y novillas cíclicas y no cíclicas:

- Introducir un CIDR 1,38 g dentro de la vagina durante 7-8 días
- Inyectar una dosis de GnRH o análogo a la introducción de CIDR 1,38 g
- Inyectar una dosis luteolítica de PGF2 α o análogo 24 horas antes de la eliminación del dispositivo.
- IATF 56 horas después de la eliminación del dispositivo.
- Inyectar GnRH o análogo 36 horas después de la eliminación de CIDR 1,38 g e IATF 16-20 horas después.

En vacas no cíclicas:

Debe usarse el siguiente protocolo de IATF:

- Introducir un CIDR 1,38 g dentro de la vagina durante 9 días
- Inyectar una dosis luteolítica de PGF2 α o análogo 24 horas antes de la eliminación del dispositivo.
- Inyectar GCe a la eliminación de CIDR 1,38 g
- IATF 56 horas después de la eliminación del dispositivo, o inseminar en un plazo de 12 horas después del primer comportamiento de estro observado.

Administración

Para la administración se debe utilizar un dispositivo aplicador siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

1. Asegurarse de que el aplicador está limpio y sumergido en una solución antiséptica no irritante antes del uso.
2. Llevando puestos guantes de plástico estériles desechables, plegar los brazos del dispositivo en el aplicador. Los brazos del dispositivo deben sobresalir ligeramente del extremo del aplicador. Se debe tener cuidado para evitar el manejo prolongado o

- innecesario del medicamento veterinario para minimizar la transferencia de sustancia activa a los guantes de operador.
3. Aplicar una pequeña cantidad de lubricante obstétrico sobre el extremo del aplicador cargado.
 4. Levantar la cola y limpiar la vulva y el perineo.
 5. Introducir suavemente el aplicador en la vagina, primero en dirección vertical y después horizontalmente hasta encontrar una cierta resistencia.
 6. Asegurarse de que la tira de extracción está suelta, presionar el asa del aplicador y dejar que se desplace el cuerpo hacia atrás en dirección al asa. Esto liberará los brazos del dispositivo con lo que se retendrá el dispositivo en la vagina anterior.
 7. Con el dispositivo correctamente colocado, extraer el aplicador dejando la tira de extracción colgando de la vulva
 8. El aplicador se debe limpiar y desinfectar antes de ser utilizado en otro animal.

Extracción

El dispositivo se puede extraer tirando suavemente de la cuerda. A veces la cuerda puede no resultar visible por fuera del animal, en esos casos se puede localizar en la vagina posterior utilizando un dedil. La extracción del dispositivo no debe requerir la aplicación de fuerza. Si se encuentra algo de resistencia deberá usarse la mano con un guante para facilitar la extracción.

Si existiera alguna dificultad en la extracción del animal después de seguir las instrucciones descritas en los puntos anteriores se debe consultar al veterinario.

El dispositivo es de un solo uso.

4.10 Sobredosificación (síntomas, procedimientos de emergencia, antídotos), si procede

No procede.

4.11 Tiempo(s) de espera

Carne: cero días

Leche: cero horas

Puede utilizarse la leche para consumo humano durante el tratamiento

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Grupo farmacoterapéutico: Sistema genito-urinario y hormonas sexuales. Progesterona, código ATCvet: QG03DA04

5.1 Propiedades farmacológicas

El sistema de liberación vaginal libera progesterona a una velocidad controlada a través de la mucosa vaginal hasta el torrente sanguíneo lo que inhibe la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina y, por consiguiente, de la hormona luteinizante desde la pituitaria anterior, inhibiendo la maduración del folículo y de este modo controlando el ciclo del estro. Después de la extracción del dispositivo, los niveles sanguíneos circulantes de progesterona descienden considerablemente en 6 horas, facilitando la maduración del folículo, el comportamiento del estro y de la ovulación.

5.2 Datos farmacocinéticos

El perfil farmacocinético de progesterona administrada en forma de dispositivo individual se caracterizó por una concentración máxima (C_{max}) en plasma de alrededor de 4,33 ng/ml alcanzada a las 1,19 horas de la administración (T_{max}) y por un Área bajo la Curva (ABC_{∞}) de 19,47 ng/ml.hr. Las concentraciones máximas fueron seguidas por un descenso en la exposición sistémica siendo la semivida de eliminación aparente ($t_{1/2}$) de 0,298 horas. Después de la extracción del dispositivo, los niveles sanguíneos circulantes de progesterona descienden rápidamente en 6 horas.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1 Lista de excipientes

Elastómero de silicona
Espina de Nylon
Cola de poliéster

6.2 Incompatibilidades

Ninguna conocida

6.3 Periodo de validez

Periodo de validez del medicamento veterinario acondicionado para su venta: 2 años.

6.4 Precauciones especiales de conservación

No conservar a temperatura superior a 30°C

6.5 Naturaleza y composición del envase primario

Los dispositivos se envasan en bolsas de polietileno de baja densidad termo-selladas, 10 unidades por bolsa. Las bolsas se pueden volver a cerrar (auto-cierre)

6.6 Precauciones especiales para la eliminación del medicamento veterinario no utilizado o, en su caso, los residuos derivados de su uso.

Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con las normativas locales.

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

Zoetis Spain, S.L.
Avda. de Europa 20 B
Parque Empresarial La Moraleja
28108 Alcobendas (Madrid)

8. NÚMERO(S) DE AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

1831 ESP

9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN O DE LA RENOVACIÓN DE AUTORIZACIÓN

19 de abril de 2013

10. FECHA DE LA REVISIÓN DEL TEXTO

29 de octubre de 2013

PROHIBICIÓN DE VENTA, DISPENSACIÓN Y/O USO

Uso veterinario-medicamento sujeto a prescripción veterinaria.
Administración exclusiva por el veterinario

PFIZER

GUÍA DE PRODUCTOS ZOOSANITARIOS AÑO 2000

EFFECTOS SECUNDARIOS:

Pueden observarse signos leves de corta duración, tales como estornudos, secreción nasal, sacudidas de cabeza, frotamiento de la nariz.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN:

Intranasal.

POSOLÓGIA:

* **Gatos:** 1 dosis (0,50 ml)/gato, por vía intranasal, inmediatamente tras la rehidratación, inoculando, por medio del aplicador, la mitad del volumen en cada fosa nasal.

- Primovacunación: aplicar a gatos con más de 16 semanas de edad.

Para que la vacuna produzca inmunidad activa frente a la enfermedad, son necesarias dos aplicaciones, separadas, por un intervalo entre ellas, de tres semanas.

- Anualmente, se aconseja una dosis de recuerdo.

PRECAUCIONES ESPECIALES:

- Con prescripción veterinaria.

MODO DE CONSERVACIÓN:

Conservar entre 2°C y 8°C. No congelar.

PRESENTACIÓN:

Envases de 1 y 10 viales monodosis, conteniendo aplicador intranasal.

Nº DE REGISTRO: 9.421

PROGESTERONA-E NEOSAN

Progestágeno y
Vitaminico,
en solución inyectable.

COMPOSICIÓN POR ML:

Progesterona 20 mg; Vitamina E 60 mg.

PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS:

Progesterona E Neosan es una asociación cuya particularidad es la potenciación y complementación de las funciones fisiológicas de la progesterona por la acción de la Vitamina E.

INTERACCIONES E INCOMPATIBILIDADES:

Oxitocina. Ergonovina. Hipófisis anterior.

INDICACIONES:

* **Todas las hembras domésticas:**

Esterilidad con ciclo oestral normal. Esterilidad con ciclo oestral anormal cuando, una vez regularizado éste, no existe gestación. Tratamiento sintomático de la ninfomanía. Metrorragias. Abortos habituales.

CONTRAINDICACIONES:

* Antes o durante el primer ciclo oestral. Tumores mamarios. Piometra.

EFFECTOS SECUNDARIOS:

Son transitorios y se observan ocasionalmente: turgencia mamaria, retención de sodio.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN:

Intramuscular.

POSOLÓGIA:

- * **Vacas y yeguas:** 5 ml.
- * **Ovejas y cabras:** 0,5-1 ml.
- * **Cerdas:** 1 ml.
- * **Perras:** 0,1-0,25 ml.

TIEMPO DE ESPERA:

No precisa.

PRECAUCIONES ESPECIALES:

- Con prescripción veterinaria.

MODO DE CONSERVACIÓN:

Conservar al abrigo de la luz y el calor.

PRESENTACIÓN:

Caja con 3 ampollas de 5 ml.

Nº DE REGISTRO: 4.395

RABDOMUN

Vacuna inactivada
rabia perros,
en suspensión inyectable.

COMPOSICIÓN POR DOSIS (1 ML):

Virus rabia, cepa Flury LEP, crecido sobre células de la línea celular BHK-21 de crecimiento continuo en suspensión, inactivado con etilamina binaria y adyuvantado con hidróxido de aluminio. (>1 U.I.)(N.I.H.)

INDICACIONES:

* **Perros y Gatos:** Profilaxis de la rabia.

CONTRAINDICACIONES:

- Retrasar la vacunación de animales enfermos o débiles hasta su total recuperación.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN:

Subcutánea o Intramuscular.

- Agitar el envase antes de proceder a la vacunación.

POSOLÓGIA:

- * **Perros y Gatos:** 1 ml/animal.
- Pauta de vacunación:
- El tiempo que media entre la vacunación y la mínima tasa de inmunidad es de 7 días.



RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO VETERINARIO

ESTRUMATE

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Cada ml contiene:

Sustancia activa:

Cloprostenol (sódico)0,25 mg

Excipientes:

Alcohol bencílico (E1519)..... 20 mg

Para la lista completa de excipientes, véase la sección 6.1.

3. FORMA FARMACÉUTICA

Solución inyectable.

Solución transparente e incolora.

4. DATOS CLÍNICOS

4.1 Especies de destino

Vacas, cerdas y yeguas.

4.2 Indicaciones de uso, especificando las especies de destino

Vacas:

- Subestro o celos silentes.
- Interrupción de la gestación, incluyendo momificación fetal.
- Tratamiento coadyuvante en endometritis crónica y piómetra.
- Tratamiento de quistes luteínicos.
- Inducción y sincronización del estro.

Cerdas:

- Inducción del parto a partir del día 113 de gestación (el último día de fecundación se considera como primer día de gestación).

Yeguas:

- Tratamiento de cuerpo lúteo persistente.
- Inducción del estro.

4.3 Contraindicaciones

No usar en animales con enfermedades respiratorias agudas o crónicas.

No usar en animales gestantes a menos que sea deseable la inducción del parto o la interrupción terapéutica de la gestación.

No usar en yeguas si existe algún indicio de alteración del tracto gastrointestinal o del sistema vascular.

No usar en animales con hipersensibilidad conocida a la sustancia activa o a algún excipiente.

4.4 Advertencias especiales para cada especie de destino

Ninguna.

4.5 Precauciones especiales de uso

Precauciones especiales para su uso en animales

No administrar por vía intravenosa.

La inyección en tejido adiposo puede ocasionar una absorción incompleta del medicamento.

El lugar de la inyección debe limpiarse y desinfectarse adecuadamente con objeto de reducir el riesgo de infección por bacterias anaerobias.

En el caso de expulsión de fetos momificados puede ser necesaria la manipulación obstétrica para extraer el feto.

En cerdas, administrar el medicamento exclusivamente cuando se conoce de forma precisa la fecha de cubrición. Si la administración es muy temprana puede verse afectada la viabilidad de los lechones.

Precauciones específicas que debe tomar la persona que administre el medicamento veterinario a los animales

Administrar el medicamento con precaución para EVITAR LA AUTOINYECCION ACCIDENTAL O EL CONTACTO CON LA PIEL.

Las prostaglandinas $F_{2\alpha}$ pueden absorberse por la piel y causar broncoespasmo y aborto. Las mujeres embarazadas, en edad fértil, asmáticos y personas con otros problemas respiratorios deben extremar las precauciones cuando manejen cloprostenol. Estas personas deben evitar el contacto, o usar guantes de plástico desechables durante la administración del medicamento.

En caso de dificultad respiratoria, consulte inmediatamente con un médico.

En caso de autoinyección accidental, contacte inmediatamente con un médico y muéstrole el prospecto o la etiqueta del medicamento. En caso de contacto accidental con la piel, lavar inmediatamente con agua y jabón.

4.6 Reacciones adversas (frecuencia y gravedad)

En raras ocasiones pueden producirse infecciones bacterianas locales, asociadas con proliferación de clostridios en el punto de inoculación. Las reacciones locales típicas debidas a infección anaerobia son inflamación y crepitación en el lugar de inyección.

Ocasionalmente se puede producir:

Vacas: Intranquilidad.

Cerdas:

- Aumento de la micción y la defecación.
- Cambios en el comportamiento similares a los que acontecen antes del parto, que pueden prolongarse durante una hora.

Yeguas:

- Sudoración.
- Trastornos abdominales.
- Postración.

En caso de producirse, estos efectos se observan dentro de los 15 minutos post- inyección y suelen desaparecer al cabo de una hora.

La inducción del parto o del aborto puede provocar distocia, muerte fetal, retención placentaria y/o metritis.

4.7 Uso durante la gestación, la lactancia o la puesta

No administrar a hembras en gestación a menos que se desee la inducción del parto o la interrupción terapéutica de la gestación. Puede utilizarse durante la lactancia.

4.8 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

En animales tratados con un progestágeno es de esperar una disminución de la respuesta al cloprostenol.

La actividad de otros agentes oxitócicos puede verse aumentada tras la administración de cloprostenol.

No administrar junto con antiinflamatorios no esteroides (AINE) ya que se inhibe la síntesis de prostaglandinas endógenas.

4.9 Posología y vía de administración

Vía intramuscular profunda.

Vacas: La dosis recomendada es de 500 µg de cloprostenol/animal (equivalente a 2 ml/animal).

Subestro o celo silente/inducción al estro: Administrar el medicamento, después de determinar la presencia de cuerpo lúteo. Se observa celo generalmente en los 2-5 días posteriores al tratamiento. Inseminar a las 72-96 horas.

Interrupción de la gestación: La administración debe realizarse entre la primera semana y el día 150 de gestación. El aborto se produce a los 4-5 días.

Endometritis o piómetra: Administrar una dosis única del medicamento. Si es necesario repetir el tratamiento 10-14 días después.

Cerdas: La dosis recomendada es de 175 µg de cloprostenol/animal (equivalente a 0,7 ml/animal) en dosis única. La administración será exclusivamente por vía intramuscular profunda empleando una aguja de longitud adecuada.

Inducción del parto: debe realizarse dentro de las 24-48 horas antes de la fecha prevista del mismo para disminuir el riesgo de mortalidad en los lechones. El parto suele producirse a las 19-29 horas de su administración.

Yeguas: La dosis recomendada es de 500 µg de cloprostenol/animal (equivalente a 2 ml/animal) en dosis única.

En ponis administrar 125-250 µg de cloprostenol/animal (equivalente a 0,5-1,0 ml/animal). En animales de pura raza, o pesados administrar 250-500 µg de cloprostenol/animal (equivalente a 1-2 ml/animal).

4.10 Sobredosificación (síntomas, medidas de urgencia, antídotos), en caso necesario

El margen de seguridad es amplio. Los síntomas producidos en el caso de sobredosificación son los mismos descritos como reacciones adversas pero con mayor intensidad.

4.11 Tiempos de espera

Bovino (vacas):

Carne: 2 días.

Leche: cero horas.

Porcino (cerdas):

Carne: 2 días.

Equino (yeguas):

Carne: 28 días.

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Grupo farmacoterapéutico: sistema genitourinario y hormonas sexuales, Oxitócicos.

Código ATCvet: QG02AD90.

5.1 Propiedades farmacodinámicas

El cloprostenol es un análogo sintético de las prostaglandinas, relacionado estructuralmente con la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Como potente agente luteolítico, produce la regresión funcional y morfológica del cuerpo lúteo (luteolisis) seguido de un retorno al estro y una ovulación normal. Estimula la musculatura lisa uterina y produce un efecto relajante sobre el cervix.

Por tanto, provoca la inducción del celo en hembras con ciclo estral normal o con cuerpo lúteo persistente, eliminando el efecto del mecanismo de retroalimentación negativa de la progesterona, y en estados de gestación induce al parto o al aborto.

Su efecto espasmogénico sobre la musculatura lisa provoca también efectos secundarios tales como: broncoconstricción, aumento de la presión sanguínea y estimulación de la motilidad de la musculatura lisa intestinal y urinaria en algunas especies.

5.2 Datos farmacocinéticos

Tras su administración por inyección intramuscular, el cloprostenol alcanza rápidamente su concentración máxima en sangre a los 30-60 minutos, y se metaboliza a ácido 8,11, dihidroxi-15-ceto prost-5-enoico y 9,11,15-trihidroxiprost-5-enoico que desaparecen rápidamente de la sangre, siendo excretados por vía urinaria en 5-6 horas.

Los estudios muestran niveles en sangre entre 0,0014 y 0,002 μg por ml a los 20 minutos - 2 horas después de la administración; disminuyen rápidamente, siendo inferiores a 0,00004 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a las 8 horas. La semivida de eliminación plasmática es de 1-3 horas.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1 Lista de excipientes

Alcohol bencílico (E1519).

Citrato de sodio.

Ácido cítrico anhidro.
Cloruro de sodio.
Agua para preparaciones inyectables.

6.2 Incompatibilidades

Productos ácidos o alcalinos fuertes.
En ausencia de estudios de compatibilidad, este medicamento veterinario no debe mezclarse con otros medicamentos veterinarios.

6.3 Período de validez

Período de validez del medicamento veterinario acondicionado para su venta: 2 años.
Período de validez después de abierto el envase primario: 28 días.

6.4 Precauciones especiales de conservación

Conservar el vial en el embalaje exterior con objeto de protegerlo de la luz.

Este medicamento veterinario no requiere condiciones especiales de temperatura de conservación.

6.5 Naturaleza y composición del envase primario

Vial de vidrio incoloro, clase I con tapón de caucho bromobutílico gris recubierto de etileno de tetrafluoroetileno (EFTE) y cápsula flip-off de aluminio cubierta con un disco de polipropileno rojo.

Formatos:

Caja con 1 vial de 10 ml
Caja con 1 vial de 20 ml
Caja con 10 viales de 20 ml

Es posible que no se comercialicen todos los formatos.

6.6 Precauciones especiales para la eliminación del medicamento veterinario no utilizado o, en su caso, los residuos derivados de su uso

Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad las normativas locales.

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

Merck Sharp & Dohme Animal Health, S.L.
Polígono Industrial El Montalvo I
C/ Zeppelin, nº 6, parcela 38
37008 Carbajosa de la Sagrada
Salamanca

8. NÚMERO DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

789 ESP

9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN/ RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN

Fecha de la primera autorización: 28/07/1993

Fecha de la última renovación: 8 de junio de 2015

10. FECHA DE LA REVISIÓN DEL TEXTO

8 de junio de 2015

PROHIBICIÓN DE VENTA, DISPENSACIÓN Y/O USO

Condiciones de dispensación: **Medicamento sujeto a prescripción veterinaria.**

Condiciones de administración: **Administración bajo control o supervisión del veterinario.**



FICHA TÉCNICA (RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO)

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO VETERINARIO

FERTAGYL

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Cada ml contiene:

Sustancia activa:

Gonadoterina (acetato) 0,1 mg

Excipientes:

Alcohol bencílico 10,0 mg

Para la lista completa de excipientes, véase la sección 6.1.

3. FORMA FARMACÉUTICA

Solución inyectable.

4. DATOS CLÍNICOS

4.1 Especies de destino

Vacas y conejas.

4.2 Indicaciones de uso, especificando las especies de destino

Vacas: Tratamiento de quistes foliculares.
Mejora de la fertilidad en hembras con antecedentes de ovulación retardada.
Inducción de la ovulación.

Conejas: Inducción de la ovulación.

4.3 Contraindicaciones

No usar en animales con hipersensibilidad conocida a la sustancia activa o a algún excipiente.

4.4 Advertencias especiales para cada especie de destino

Ninguna.

4.5 Precauciones especiales de uso

Precauciones especiales para su uso en animales

No procede.

Precauciones específicas que debe tomar la persona que administre el medicamento a los animales

Este medicamento no debe ser administrado por mujeres gestantes.

Administrar el medicamento con precaución para evitar la autoinyección accidental. En caso de autoinyección accidental, consulte con un médico inmediatamente y muéstrole el prospecto o la etiqueta.

Evitar el contacto con la piel o los ojos. En caso de contacto accidental lavar inmediatamente con agua abundante.

Se recomienda el uso de guantes al manipular el medicamento.

4.6 Reacciones adversas (frecuencia y gravedad)

No se han descrito.

4.7 Uso durante la gestación, la lactancia o la puesta

Su uso no está recomendado durante la gestación.

Puede utilizarse durante la lactancia.

4.8 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

CORREO ELECTRONICO

Sugerencias_ft@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8
28022 MADRID

Ninguna conocida.

4.9 Posología y vía de administración

Vía intramuscular.

La dosis varía en función de la especie y la indicación:

ESPECIES DE DESTINO	INDICACIÓN	DOSIS (por animal)
Vacas	Tratamiento de ovarios quísticos	0,5 mg de gonadorelina (5,0 ml)
	Mejora de fertilidad en vacas repetidoras cuando se administra en el momento de la IA	0,25 - 0,5 mg de gonadorelina (2,5 - 5,0 ml)
	Mejora de la fertilidad cuando se administra en mitad del ciclo (días 11-14)	0,25 - 0,5 mg de gonadorelina (2,5 - 5,0 ml)
	Mejora de la fertilidad cuando se administra en el período post-parto (<día 40)	0,1 - 0,25 mg de gonadorelina (1,0 - 2,5 ml)
Conejas	Inducción de la ovulación	0,02 mg de gonadorelina (0,2 ml)

4.10 Sobredosificación (síntomas, medidas de urgencia, antídotos), en caso necesario

El medicamento tiene un amplio margen de seguridad.

4.11 Tiempos de espera

Bovino: Carne: cero días.

Leche: cero días.

Conejos: Carne: cero días.

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Grupo farmacoterapéutico: hormonas hipotalámicas e hipofisarias y sus análogos.

Código ATCvet: QH01CA01

5.1 Propiedades farmacodinámicas

La gonadorelina es el análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona natural secretada por el hipotálamo y que a nivel de la hipófisis estimula la síntesis y la liberación de las gonadotropinas: LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona foliculoestimulante). La FSH estimula la formación y crecimiento del folículo y la LH es responsable de la maduración de dicho folículo y finalmente de la ovulación.

5.2 Datos farmacocinéticos

Las concentraciones máximas tras la administración intramuscular se obtienen después de 17,5 min. La biodisponibilidad de la GnRH administrada por vía intramuscular es del 35,6 % en comparación con la administración por vía intravenosa.

La gonadorelina se absorbe rápidamente tras la administración intramuscular. Se distribuye sobre todo en la hipófisis, en los ovarios, hígado y riñón.

Se metaboliza rápidamente en péptidos inactivos y aminoácidos. La principal vía de excreción es la renal.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1 Lista de excipientes

Alcohol bencílico
Cloruro de sodio
Ácido acético
Hidróxido de sodio
Agua para preparaciones inyectables.

6.2 Incompatibilidades

Ninguna conocida.

6.3 Período de validez

Período de validez del medicamento veterinario acondicionado para su venta: 2 años.
Período de validez después de abierto el envase primario: uso inmediato.

6.4 Precauciones especiales de conservación

Conservar a temperatura inferior a 25°C. Conservar el vial en el embalaje exterior con objeto de protegerlo de la luz.
El medicamento debe utilizarse inmediatamente y no almacenarse después de su apertura.

6.5 Naturaleza y composición del envase primario

Vial de vidrio tipo I (Farm. Eur.) con tapón de goma de bromobutilo y cápsula de aluminio.

Formatos:

Caja con 1 vial de 5 ml
Caja con 10 viales de 5 ml
Es posible que no se comercialicen todos los formatos.

6.6 Precauciones especiales para la eliminación del medicamento veterinario no utilizado o, en su caso, los residuos derivados de su uso

Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con las normativas locales.

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

Merck Sharp & Dohme Animal Health, S.L.
Polígono Industrial El Montalvo I
C/ Zeppelin nº 6, Parcela 38
37008 Carbajosa de la Sagrada
Salamanca

8. NÚMERO DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

Número de la autorización de comercialización antiguo revocado: **8.522 Imp**
Nuevo número de autorización de comercialización: **2.664 ESP**

9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN / RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN

Fecha de la primera autorización: 27 de abril de 1982
Fecha renovación: 6 de noviembre de 2012

10. FECHA DE LA REVISIÓN DEL TEXTO

6 de noviembre de 2012

PROHIBICIÓN DE VENTA, DISPENSACIÓN Y/O USO

Condiciones de dispensación: **Medicamento sujeto a prescripción veterinaria.**



Condiciones de administración: **Administración bajo control o supervisión del veterinario.**



FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO VETERINARIO

FOLIGON 1000 U.I.

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Cada vial de polvo contiene:

Sustancia activa:

Gonadotropina sérica equina (PMSG)..... 1000 U.I.

Excipientes, c.s.

Cada vial de disolvente (5 ml) contiene:

Excipientes, c.s.

Para la lista completa de excipientes, véase la sección 6.1.

1 ml de solución reconstituida contiene 200 U.I. de gonadotropina sérica equina para uso veterinario.

3. FORMA FARMACÉUTICA

Polvo y disolvente para solución inyectable.

4. DATOS CLÍNICOS

4.1 Especies de destino

Bovino (vacas adultas y novillas), ovejas y cabras.

4.2 Indicaciones de uso, especificando las especies de destino

Vacas: Inducción y sincronización de la ovulación.

Superovulación para la transferencia de embriones.

Novillas, ovejas y cabras: Inducción y sincronización de la ovulación.

4.3 Contraindicaciones

No usar en animales con hipersensibilidad conocida a las gonadotropinas.

No administrar a hembras con ovarios poliquísticos.

4.4 Advertencias especiales para cada especie de destino

Ajustar la dosis. Dosis elevadas de PMSG no dan lugar a un aumento de la eficacia del medicamento.

La administración repetida de PMSG en cabras puede dar como resultado la producción de anticuerpos PMSG.

4.5 Precauciones especiales de uso

Precauciones especiales para su uso en animales

En caso de shock anafiláctico debe administrarse tratamiento sintomático (Por ejemplo, adrenalina o corticoesteroides).

Precauciones específicas que debe tomar la persona que administre el medicamento veterinario a los animales

Las personas con hipersensibilidad conocida a la sustancia activa o a alguno de los excipientes deben evitar todo contacto con el medicamento veterinario.

Dado que la PMSG puede afectar a la función de las gónadas, se deberá administrar el medicamento con precaución para evitar la auto-inyección accidental. Las mujeres embarazadas o lactantes deberán extremar esta precaución durante la manipulación del medicamento.

En caso de auto-inyección accidental, consulte con un médico inmediatamente y muéstrela el prospecto o la etiqueta.

Evitar el contacto con la piel. Utilizar guantes.

En caso de derrame sobre la piel o las mucosas, lavar la zona afectada con agua abundante.

4.6 Reacciones adversas (frecuencia y gravedad)

Para las especies distintas a la equina la PMSG es una proteína exógena. Por lo tanto, pueden producirse reacciones antígeno-anticuerpo. En casos raros, la administración repetida de PMSG puede provocar shock anafiláctico (ver la sección 4.5).

4.7 Uso durante la gestación, la lactancia o la puesta

No utilizar este medicamento durante la gestación.

4.8 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

Ninguna conocida.

4.9 Posología y vía de administración

Administración: Vía intramuscular.

Preparar inmediatamente antes de su uso.

Reconstituir disolviendo la pastilla de polvo en aproximadamente 5 ml de disolvente proporcionado agitar suavemente e inyectar la solución resultante en el vial de disolvente para mezclar con el disolvente restante. Administrar mediante inyección intramuscular utilizando las precauciones asépticas normales.

Especies	Indicación	Dosis de	Volumen de	Observaciones
----------	------------	----------	------------	---------------



de destino		FOLIGON 1000 U.I. (expresada como U.I. de PMSG/animal)	solución reconstituida (200 U.I. /ml) correspondiente a dosis	
Bovino (vacas y novillas)	Inducción y sincronización de la ovulación	300-800	1,5-4 ml	Al final del tratamiento con progestágenos. Los animales no cíclicos deben recibir la dosis más alta.
	Superovulación	1500-3000	7,5-15 ml	Preferiblemente entre el día 8 y el día 13 del ciclo o hacia el final de un tratamiento de sincronización a base de progestágenos.
Ovejas y cabras	Inducción y sincronización de la ovulación	400-750	2-3,75 ml	Al final de un tratamiento progestágeno. Las dosis administradas deben adaptarse a la raza (dosis más bajas en razas prolíficas en comparación con razas no prolíficas) y a la estación (deben administrarse dosis más altas a las ovejas no cíclicas en comparación con las cíclicas).

4.10 Sobredosificación (síntomas, medidas de urgencia, antídotos), en caso necesario

La administración de cantidades del medicamento que excedan las recomendadas puede dar lugar a superovulaciones y/o gestaciones en número elevado de crías. Esto implica un aumento del índice de mortalidad embrionaria o neonatal y una reducción en la fertilidad en las hembras.

4.11 Tiempos de espera

Carne: cero días.

Leche: cero días.

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Grupo farmacoterapéutico: Hormonas sexuales y moduladores del sistema genital.

Código ATC vet: QG03GA03

5.1 Propiedades farmacodinámicas

La gonadotropina sérica equina (PMSG) es una glicoproteína de gran tamaño que se forma en las copas endometriales del útero de las yeguas gestantes y se obtiene directamente del suero o del plasma de estos animales.

Su actividad fisiológica es semejante a la de la hormona hipofisaria folículo estimulante (FSH), aunque también presenta cierta actividad típica de la hormona hipofisaria luteinizante (LH); dichas propiedades folículoestimulantes y luteinizantes son las responsables de su actividad farmacológica. La PMSG induce la maduración de los folículos ováricos mediante la estimulación del crecimiento y desarrollo de los folículos antrales.

5.2 Datos farmacocinéticos

Tras la inyección intramuscular, la absorción de la PMSG es rápida, Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en 8 horas (oveja) o 16 horas (bovino) siendo la biodisponibilidad elevada en ambas especies (93% en ovino y 72% en bovino). La eliminación plasmática de PMSG es bifásica y caracterizada por semividas de eliminación prolongadas (35 horas en ovino y 150 horas en bovino). La PMSG se degrada principalmente en hígado y riñón y se excreta por la orina.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1 Lista de excipientes

Del polvo:

Manitol
Hidrógenofosfato de disodio dihidrato
Dihidrógenofosfato de sodio dihidrato
Hidróxido de sodio
Ácido fosfórico
Agua para preparaciones inyectables

Del disolvente para reconstitución:

Hidrógenofosfato de disodio dihidrato
Dihidrógenofosfato de sodio dihidrato
Hidróxido de sodio
Ácido fosfórico
Agua para preparaciones inyectables

6.2 Incompatibilidades

Ninguna conocida.

No mezclar con ningún otro medicamento veterinario, excepto el diluyente.

6.3 Período de validez

Período de validez del medicamento veterinario acondicionado para su venta: 3 años.

Período de validez después de abierto el envase primario: uso inmediato.

Período de validez después de su reconstitución según las instrucciones: 24 horas entre 2°C y 8°C.

6.4 Precauciones especiales de conservación

Conservar en nevera (entre 2°C y 8°C).

Tras la reconstitución conservar en nevera entre 2°C y 8°C no más de 24 horas.

6.5 Naturaleza y composición del envase primario

Polvo: Viales de vidrio incoloro (tipo I F. Eur.) de 5 ml cerrados con tapón de goma bromobutilo y cápsula de aluminio.

Disolvente: Viales de vidrio incoloro (tipo I F. Eur.) cerrados con tapón de goma bromobutilo y cápsula de aluminio.

Formato:

Caja con 5 viales de 1000 U.I. + 5 viales de 5 ml de disolvente.

6.6 Precauciones especiales para la eliminación del medicamento veterinario no utilizado o, en su caso, los residuos derivados de su uso

Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con las normativas locales.

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

Merck Sharp & Dohme Animal Health, S.L.
Polígono Industrial El Montalvo I
C/ Zeppelin, nº 6, parcela 38
37008 Carbajosa de la Sagrada
Salamanca

8. NÚMERO DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

2828 ESP

9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN / RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN

Fecha de la primera autorización: 21/04/1980

Fecha de la última renovación: 25 de junio de 2013

10. FECHA DE LA REVISIÓN DEL TEXTO

13 de enero de 2014

PROHIBICIÓN DE VENTA, DISPENSACIÓN Y/O USO

Condiciones de dispensación: **Medicamento sujeto a prescripción veterinaria.**

Condiciones de administración: **Administración bajo control o supervisión del veterinario.**



Datos Básicos

Tipo animal: caballo, cerdo, Yeguas, Vacas Ovejas, Formas de dosificación: Inyección

Especificaciones

Inyectable Terapia hormonal estrogénica

COMPOSICIÓN:

17 β estradiol benzoato	50 mg
Vitamina A (retinol palmitato)	125,000 U.I.
Vitamina E (DL-a-tocoferol acetato)	50 mg
Excipiente, c.b.p.	10 ml.

INDICACIONES: Terapia hormonal estrogénica en yeguas, vacas, ovejas, cabras, cerdas y perras en los siguientes casos: Falta de celo o disminución de la función ovárica. Frigidez. Anafrodisia. Retención de membranas fetales, fetos momificados o muertos. Metritis.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN: Inyección subcutánea.

DOSIFICACIÓN Y MODO DE EMPLEO:

Vacas y yeguas: 4 a 8 ml, pudiendo repetir la dosis 4 veces con intervalos de 4 días entre cada inoculación.

Cerdas: 5 ml, pudiendo repetir 3 veces como máximo, con 3 días de intervalo entre cada inoculación.

Ovejas: 4 ml, repitiendo a los 4 días.

Cabras: 4 ml, repitiendo a los 4 días.

Perras: 1 ml por cada 5 kg de peso vivo, repitiendo a los 4 días.

Las dosis señaladas anteriormente deben considerarse orientativas, toda vez que será el Médico Veterinario quien establezca la dosis adecuada en función del proceso a tratar.

PERIODO DE SUPRESIÓN: No usar el producto 15 días antes del sacrificio de los animales destinados para consumo humano. El producto no requiere de tiempo de retiro en leche.

PRESENTACIONES:

Envase con 10 ml.

Envase con 100 ml.



RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO VETERINARIO

FINADYNE 50 mg/ml SOLUCIÓN INYECTABLE

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Cada ml contiene:

Sustancia activa:

Flunixinio (meglumina) 50 mg*

*Equivalente a 83 mg de flunixinio meglumina.

Excipientes:

Fenol 5 mg

Formaldehido sulfoxilato sódico 2,5 mg

Para la lista completa de excipientes, véase la sección 6.1.

3. FORMA FARMACÉUTICA

Solución inyectable.

4. DATOS CLÍNICOS

4.1 Especies de destino

Caballos, bovino y porcino.

4.2 Indicaciones de uso, especificando las especies de destino

Caballos: Control de la inflamación, la pirexia y/o el dolor asociados a las alteraciones musculoesqueléticas o en el caso de cólico.

Bovino: Control de la inflamación, la pirexia y/o el dolor asociados a patologías agudas que cursen con estos síntomas, especialmente los procesos respiratorios y gastrointestinales y la mastitis.

Porcino: Como adyuvante en el tratamiento del síndrome metritis-mastitis-agalaxia.

4.3 Contraindicaciones

No usar en los siguientes casos:

- Hipersensibilidad a la sustancia activa, a alguno de los excipientes o a otros AINEs.
- Animales que padezcan enfermedades cardíacas, hepáticas o renales.
- Animales con lesiones del tracto gastrointestinal, como úlceras y hemorragias.
- Cuando existan signos de discrasias sanguíneas o alteración de la hemostasia.
- Cólico causado por íleo y asociado a deshidratación.
- Animales que padezcan desórdenes musculoesqueléticos crónicos.
- En las 48 horas anteriores a la fecha prevista para el parto en las vacas.

4.4 Advertencias especiales para cada especie de destino

La causa de la inflamación, el dolor o el cólico debe ser determinada y tratarse con una terapia concomitante adecuada.

Los AINEs pueden causar inhibición de la fagocitosis y, por tanto, en el tratamiento de estados inflamatorios asociados a infecciones bacterianas, debe establecerse una terapia antimicrobiana concurrente apropiada.

Su uso no está autorizado en yeguas en lactación cuya leche se utiliza para consumo humano.

4.5 Precauciones especiales de uso

Precauciones especiales para su uso en animales

No exceder la dosis ni la duración del tratamiento recomendado.

Se debe evitar la inyección intraarterial en caballos y en vacas. Los caballos a los que se administre accidentalmente el medicamento por vía intraarterial pueden presentar las siguientes reacciones adversas: ataxia, incoordinación, hiperventilación, excitabilidad y debilidad muscular. Son signos transitorios y desaparecen en pocos minutos sin necesidad de antídoto.

El uso en animales menores de 6 semanas de edad o en animales de edad avanzada podría implicar un riesgo adicional. Si tal uso no puede ser evitado, los animales podrían requerir una dosis reducida y un seguimiento clínico cuidadoso.

En la administración intramuscular en porcino, debe evitarse depositar el medicamento en el tejido adiposo.

Se debe evitar el uso en cualquier animal deshidratado, hipotenso o hipovolémico ya que existe un riesgo potencial de toxicidad renal aumentada, excepto en el caso de endotoxemia o shock séptico.

Administrar el medicamento a temperatura ambiente. La inyección intravenosa debe ser lenta.

Durante el tratamiento se debe proporcionar un suministro de agua adecuado.

Es preferible no administrar AINEs a animales sometidos a una anestesia general hasta que se hayan recuperado completamente.

El uso de AINEs en caballos no esté permitido en la reglamentación relativa a carreras y otros eventos competitivos.

Se sabe que los AINEs tienen potencial para retrasar el parto a través de un efecto tocolítico por inhibición de prostaglandinas, que son importantes en la señalización del inicio del parto. El uso del producto en el período inmediatamente posterior al parto puede interferir en la involución uterina y en la expulsión de las membranas fetales dando lugar a una retención placentaria. Ver también la sección 4.7.

Precauciones específicas que debe tomar la persona que administre el medicamento veterinario a los animales

Las personas con hipersensibilidad conocida a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y/o al polietilenglicol deben evitar todo contacto con el medicamento veterinario.

Este medicamento puede causar irritación dérmica y ocular. Evitar el contacto con la piel y los ojos. Usar guantes y gafas protectoras al manipular el medicamento veterinario. Lavarse las manos después de usar el producto. En caso de contacto dérmico accidental, lavar el área expuesta inmediatamente con agua abundante. En caso de contacto accidental con los ojos, consulte con un médico inmediatamente y muéstrele el prospecto o la etiqueta.

En caso de autoinyección accidental, puede causar dolor agudo e inflamación. Limpie y desinfecte la herida inmediatamente y consulte con un médico y muéstrele el prospecto o la etiqueta.

4.6 Reacciones adversas (frecuencia y gravedad)

En muy raras ocasiones se pueden observar reacciones locales transitorias en el punto de inyección, así como otros efectos adversos comunes a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), grupo al que pertenece el Flunixin, tales como:

- irritación y ulceración gastrointestinal.
- riesgo potencial de toxicidad renal, que aumenta en el caso de animales deshidratados, hipovolémicos o hipotensos.
- otros efectos, como vómitos, ataxia e hiperventilación.

Tanto en equino como en bovino puede tener lugar un shock anafiláctico tras la inyección intravenosa rápida.

El medicamento debe ser, por tanto, inyectado lentamente y debe administrarse a la temperatura corporal. La administración debe ser interrumpida inmediatamente si los signos de intolerancia ocurren y, si fuese necesario, iniciar el tratamiento para shock.

La frecuencia de las reacciones adversas se debe clasificar conforme a los siguientes grupos:

- Muy frecuentemente (más de 1 animal por cada 10 presenta reacciones adversas durante un tratamiento).
- Frecuentemente (más de 1 pero menos de 10 animales por cada 100).
- Infrecuentemente (más de 1 pero menos de 10 animales por cada 1.000).
- En raras ocasiones (más de 1 pero menos de 10 animales por cada 10.000).
- En muy raras ocasiones (menos de 1 animal por cada 10.000, incluyendo casos aislados).

4.7 Uso durante la gestación, la lactancia o la puesta

No ha quedado demostrada la seguridad del medicamento veterinario durante la gestación o la lactancia.

Utilícese únicamente de acuerdo con la evaluación beneficio/riesgo efectuada por el veterinario responsable.

El medicamento debe ser administrado únicamente durante las primeras 36 horas post-parto de acuerdo con la evaluación beneficio/riesgo efectuada por el veterinario responsable y los animales tratados deben ser monitorizados para retención de la placenta.

4.8 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

Se debe evitar la administración concurrente de fármacos potencialmente nefrotóxicos (p.ej: antibióticos aminoglucósidos, metoxifluorano).

Flunixin puede disminuir la excreción renal de algunos fármacos, incrementando su toxicidad, como ocurre con los aminoglucósidos.

El uso simultáneo de otras sustancias activas con elevada capacidad de unión a proteínas plasmáticas puede crear una competencia y desplazar al flunixinio, provocando efectos tóxicos. El tratamiento previo con otras sustancias antiinflamatorias puede dar como resultado efectos adversos adicionales o aumentados. Por tanto, se debe dejar un período libre de tratamiento con tales sustancias de al menos 24 horas antes del comienzo del tratamiento con flunixinio. El período libre de tratamiento, no obstante, debe tener en cuenta las propiedades farmacocinéticas de los productos utilizados previamente.

El medicamento no debe administrarse junto con otros AINEs o glucocorticoides, ya que se incrementaría la toxicidad de ambos, especialmente a nivel gastrointestinal, aumentando el riesgo de sufrir úlceras gastrointestinales.

Flunixinio puede disminuir el efecto de algunos antihipertensores, al inhibir la síntesis de prostaglandinas, tales como los diuréticos, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECAs), antagonistas de los receptores de angiotensina (ARAs) y beta-bloqueantes.

Los pacientes que requieren terapia conjunta deben ser cuidadosamente controlados con el fin de determinar la compatibilidad de flunixinio con otros fármacos.

No se debe mezclar Finadyne 50 mg/ml Solución Inyectable con otros fármacos antes de la administración.

4.9 Posología y vía de administración

Vías de administración:

Caballos y bovino: Intravenosa.

Porcino: Intramuscular.

Posología:

Caballos:

– La dosis recomendada para alteraciones musculoesqueléticas es de 1,1 mg de flunixinio por kg de peso vivo, que corresponde a 1 ml de Finadyne 50 mg/ml Solución Inyectable por cada 45 kg, una vez al día. El tratamiento puede administrarse mediante inyección intravenosa y repetirse durante 5 días.

– La dosis recomendada para aliviar el dolor asociado a cólico es de 1,1 mg de flunixinio por kg de peso vivo, que corresponde a 1 ml de Finadyne 50 mg/ml Solución Inyectable por cada 45 kg, por vía intravenosa. En la mayoría de los casos, una única inyección es suficiente para controlar los signos del cólico, una vez se ha determinado la causa del mismo y se ha instaurado el tratamiento adecuado. No obstante, si los signos clínicos persisten o reaparecen, puede administrarse una segunda o una tercera inyección, con un intervalo entre ellas de entre 6 y 12 horas.

Bovino:

La dosis recomendada es de 2,2 mg de flunixinio por kg de peso vivo, que corresponde a 2 ml de Finadyne 50 mg/ml Solución Inyectable por cada 45 kg, por vía intravenosa. La administración puede repetirse, con un intervalo de 24 horas, hasta un total de 3 días consecutivos en caso necesario, en función de la respuesta clínica.

Porcino:

Administrar 2,2 mg de flunixinio por kg de peso vivo, que corresponde a 2 ml de Finadyne 50 mg/ml Solución Inyectable por cada 45 kg, por vía intramuscular profunda (5 cm). Pueden administrarse 1 ó 2 inyecciones separadas por un intervalo de 12 horas. El número de tratamientos a administrar (uno o dos) dependerá de la respuesta clínica obtenida.

El volumen administrado por punto de inyección no debe exceder 3 ml.

4.10 Sobredosificación (síntomas, medidas de urgencia, antídotos), en caso necesario

Al tratarse de un antiinflamatorio no esteroideo, la sobredosificación de flunixin meglumina se asocia con toxicidad gastrointestinal, pudiendo provocar vómitos, diarrea, melena, etc. También pueden aparecer signos de incoordinación y ataxia.

Los estudios de tolerancia en las especies de destino han demostrado que el medicamento es, en general, bien tolerado, describiéndose únicamente reacciones locales, consistentes en irritación transitoria en el punto de inyección.

4.11 Tiempos de espera

Bovino: Carne: 4 días.
Leche: 24 horas.

Porcino: Carne: 24 días.

Caballos: Carne: 4 días.

Su uso no está autorizado en yeguas en lactación cuya leche se utiliza para consumo humano.

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Grupo farmacoterapéutico: Productos antiinflamatorios y antirreumáticos.
Código ATCvet: QM01AG90

5.1 Propiedades farmacodinámicas

Flunixin meglumina es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo y, por tanto, posee también actividad analgésica y antipirética.

Flunixin meglumina actúa como un inhibidor reversible no selectivo de la enzima ciclooxigenasa (ambas formas, COX-1 y COX-2), encargada de convertir el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos, los cuales se transforman en prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Las prostaglandinas son importantes mediadores del proceso inflamatorio, implicadas en la piroxia central, la percepción del dolor y la inflamación tisular. Por su parte, el tromboxano es un potente proagregante plaquetario y vasoconstrictor que se libera durante la coagulación sanguínea.

Los efectos terapéuticos del flunixin son consecuencia de la inhibición de la síntesis de estas sustancias.

Debido a la implicación de las prostaglandinas en otros procesos fisiológicos, la inhibición de la COX sería también responsable de diferentes reacciones adversas, como el daño gastrointestinal o renal. Aunque el flunixin no tiene efecto directo sobre las endotoxinas después de que han sido producidas, reduce la producción de prostaglandinas, las cuales forman parte de los complejos procesos implicados en el desarrollo del shock endotóxico.

Sin embargo, el periodo de vida de las prostaglandinas es extremadamente corto (aproximadamente 5 minutos) y, por este motivo, la inhibición de la síntesis por flunixin tiene un efecto muy rápido.

El flunixin no tiene influencia sobre la prostaglandina F₂ alfa (PGF₂α) inyectada, así como tampoco posee efecto inmunosupresor ni otros efectos típicos de los glucocorticoides.

La prolongación del tiempo de sangrado tras la administración de flunixinina es insignificante en comparación con el efecto de la aspirina.

El flunixinina no es narcótico.

La potencia del efecto del flunixinina en trastornos musculoesqueléticos es 4 veces mayor que la de la fenilbutazona.

5.2 Datos farmacocinéticos

Tras la administración de flunixinina meglumina a equinos (caballos y pones) por vía intravenosa a una dosis de 1,1 mg/kg, la cinética del fármaco se ajustó a un modelo bicompartimental. Mostró una rápida distribución (volumen de distribución de 0,16 l/kg), con una elevada proporción de unión a las proteínas plasmáticas (superior al 99%). La semivida de eliminación estuvo comprendida entre 1 y 2 horas. Se determinó un AUC_{0-15h} de 19,43 µg•h/ml. La excreción tuvo lugar de forma rápida, principalmente a través de la orina, alcanzándose la concentración máxima en la misma a las 2 horas de la administración. Después de 12 horas de la inyección intravenosa, se había recuperado en la orina un 61% de la dosis administrada.

En ganado bovino, después de administrar una dosis de 2,2 mg/kg por vía intravenosa, se obtuvieron unos niveles plasmáticos máximos de entre 15 y 18 µg/ml tras 5 - 10 minutos de la inyección. Entre las 2 y las 4 horas después se observó un segundo pico de concentración plasmática (debido, posiblemente, a la circulación enterohepática), mientras que, a las 24 horas, las concentraciones fueron inferiores a 0,1 µg/ml. Flunixinina meglumina se distribuye rápidamente en los órganos y fluidos corporales (con elevada persistencia en el exudado inflamatorio), con un volumen de distribución de entre 0,7 y 2,3 l/kg. La semivida de eliminación fue, aproximadamente, de entre 4 y 7 horas. En relación con la excreción, ésta tuvo lugar principalmente mediante la orina y las heces. En la leche, el fármaco no fue detectado, y en los casos en que se detectó, los niveles fueron insignificantes (<10 ng/ml).

En cerdos, tras la administración intramuscular de 2,2 mg/kg de flunixinina meglumina, se detectó una concentración plasmática máxima de alrededor de 3 µg/ml aproximadamente 20 minutos después de la inyección. La biodisponibilidad, expresada como fracción de la dosis absorbida, resultó ser del 93%. El volumen de distribución fue de 2 l/kg, mientras que la semivida de eliminación fue de 3,6 horas. La excreción (la mayor parte como fármaco inalterado) tuvo lugar fundamentalmente con la orina, aunque también se detectó en las heces.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1 Lista de excipientes

Fenol.

Formaldehído sulfoxilato sódico

Propilenglicol.

Edetato de disodio

Ácido clorhídrico.

Dietanolamina

Agua para preparaciones inyectables

6.2 Incompatibilidades

En ausencia de estudios de compatibilidad, este medicamento veterinario no debe mezclarse con otros medicamentos.

6.3 Período de validez

Período de validez del medicamento veterinario acondicionado para su venta: 3 años.
Período de validez después de abierto el envase primario: 28 días.

6.4. Precauciones especiales de conservación

Conservar a temperatura inferior a 25°C.

6.5 Naturaleza y composición del envase primario

Viales de vidrio tipo I, cerrados con tapones de caucho butílico y cápsula de aluminio.

Formatos:

Caja con 1 vial de 50 ml.
Caja con 1 vial de 100 ml.
Caja con 1 vial de 250 ml.
Caja con 10 viales de 50 ml.
Caja con 24 viales de 50 ml.

Es posible que no se comercialicen todos los formatos.

6.6 Precauciones especiales para la eliminación del medicamento veterinario no utilizado o, en su caso, los residuos derivados de su uso

Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con las normativas locales.

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

Merck Sharp & Dohme Animal Health, S.L.
Polígono Industrial El Montalvo I
C/ Zeppelin, nº 6, parcela 38
37008 Carbajosa de la Sagrada
Salamanca

8. NÚMERO DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

2344 ESP

9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN/RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN

Fecha de la primera autorización: 15 de marzo de 1983
Fecha de la última renovación: 19 de Enero de 2015

10. FECHA DE LA REVISIÓN DEL TEXTO



19 de Enero de 2015

PROHIBICIÓN DE VENTA, DISPENSACIÓN Y/O USO

Condiciones de dispensación: **Medicamento sujeto a prescripción veterinaria.**

Condiciones de administración: **Administración exclusiva por el veterinario.**



ANEXO I FICHA TÉCNICA (RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO)

1. DENOMINACIÓN DEL MEDICAMENTO

ANESVET

2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA.

NOMBRE	CANTIDADES	UNIDADES
Hidrocloruro de Lidocaína (equivalente a 1,62 g de Lidocaína base)	2	g
Adrenalina	2	mg
Clorobutanol hemihidratado (cloretona)	0,2	g
Excipiente, c.s.p.	100	ml

3. FORMA FARMACÉUTICA

Solución inyectable.

4. DATOS CLÍNICOS

4.1. Especies de destino.

Perros, gatos y équidos.

4.2. Indicaciones y especies de destino.

Anestesia local.

4.3. Contraindicaciones.

No administrar por la vía intravenosa.

No aplicar un torniquete cuando se utilice este producto o cualquier vasoconstrictor.

No usar en animales con hipersensibilidad a la lidocaína o anestésicos locales tipo amida.

No administrar en áreas inflamadas.

No usar para la anestesia perivenosa.

No usar animales con enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes e hipertiroidismo.

4.4. Advertencias especiales para cada especie de destino.

Para anestesia por infiltración se debe utilizar el calibre de aguja más pequeño posible.

4.5 Precauciones especiales de uso.

Precauciones especiales para su uso en animales:

No administrar por la vía intramuscular. Siempre comprobar que no se administre el producto en un vaso sanguíneo aspirando previamente.

Se recomienda empezar por la menor cantidad posible.

Evitar administrar el producto en partes acras (oreja, rabo, etc.).

Precauciones específicas que debe tomar la persona que administre el medicamento a los animales:

En caso de autoadministración, autoinyección, o derrame sobre la piel accidental, consulte con un médico inmediatamente y muéstrelle el prospecto o la etiqueta.

Este producto no debe ser administrado por mujeres embarazadas.

Se recomienda la utilización de guantes al administrar el producto.

4.6. Reacciones adversas (frecuencia y gravedad).

En animales sensibles, puede aparecer metahemoglobinemia o reacciones alérgicas a anestésicos locales como irritación tisular.

La adrenalina puede producir efectos en el sistema nervioso central como excitación, depresión, cefalea, ansiedad o hemorragia cerebral. La epinefrina/adrenalina también puede dar lugar a la disminución de actividad en el tracto gastrointestinal, incremento del rendimiento cardíaco, presión sanguínea y glucosa en sangre, broncoconstricción, arritmias ventriculares y otros efectos resultantes de la estimulación de los receptores adrenérgicos.

En la anestesia epidural en caballos, si hay una amplia extensión craneal de la solución anestésica local puede dar lugar a ataxia, marcha tambaleante, excitación y postración del animal por un bloqueo prolongado de las fibras motoras.

4.7. Uso durante la gestación, la lactancia o la puesta.

Su uso no está recomendado durante la gestación o lactancia. La epinefrina/adrenalina cruza la placenta y llega a la leche. Su efecto alfa-adrenérgico puede disminuir el flujo sanguíneo uterino y su efecto beta-adrenérgico puede retardar el trabajo del parto y aumentar la necesidad de suplementos de oxitocina.

Se ha indicado que la difusión y profundidad de la anestesia epidural o espinal es mayor en las pacientes gestantes, por lo tanto se aconseja reducir la dosis administrada por la vía epidural.

4.8. Interacciones con otros medicamentos y otras formas de interacción.

Lidocaína - El uso de anestésicos locales junto con relajantes musculares potencia la acción de ambos.

El uso junto con barbitúricos así como con anestésicos halogenados y digitálicos, potencia la toxicidad en el sistema nervioso central y sistema cardiovascular.

Epinefrina – aumenta su efecto con antidepresivos tricíclicos y bretilio; disminuye el tiempo de inicio de acción y mejora la calidad de la anestesia espinal y epidural.

4.9. Posología y vía de administración.

Vía subcutánea y epidural (équidos).

Subcutánea (por infiltración):

Perros y gatos: 5-10 mg de hidrocóloruro de lidocaína + 5-10 µg de adrenalina (equivalente a 0,25-0,5 ml de ANESVET).

Équidos: 10-20 mg de hidrocóloruro de lidocaína + 10-20 µg de adrenalina (equivalente a 0,5-1 ml de ANESVET).

La dosis debe valorarse en función de la especie, región objeto de la anestesia y la superficie de la zona a tratar. En cualquier caso, se recomienda usar la menor dosis posible. El comienzo del efecto anestésico se prevé entre aproximadamente 5-15 minutos (équidos) tras la última inyección.

Epidural caudal (solo équidos): 100-200 mg de hidrocóloruro de lidocaína + 100-200 µg de adrenalina (equivalente a 5-10 ml de ANESVET).

La dosis a administrar en cada caso debe valorarse de forma individualizada y según la respuesta al producto de cada animal.

4.10 Sobredosificación (síntomas, medidas de urgencia, antídotos).

La sobredosificación de lidocaína por inyección intravenosa accidental o por administración de grandes dosis es bifásica. En primer lugar se origina una estimulación del sistema nervioso central, con inquietud, temblores musculares y vómitos según especie, llegando a convulsiones clónicas y, aunque no es frecuente en animales domésticos, muerte por fallo respiratorio. La estimulación va seguida de depresión, con somnolencia, disminución de los reflejos e incoordinación motora.

En estos casos se aplicará un barbitúrico de acción corta por vía intravenosa y se administrará oxígeno.

El exceso de adrenalina puede provocar necrosis tisular por hipoxia.

Adrenalina: nerviosismo, sudores, temblores musculares, debilidad y vómitos. Puede manifestarse principalmente por efectos en el SNC. El animal parece somnoliento o agitado y puede progresar a movimientos musculares involuntarios, convulsiones, en gatos supresión cardíaca excitación del SNC.

4.11. Tiempo de espera.

Équidos: 7 días.

5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Código ATC Vet: QN01BB52 Grupo: Anestésico local.

5.1. Propiedades farmacodinámicas.

La Lidocaína es un anestésico local que actúa bloqueando la conducción del impulso nervioso. Sus efectos son reversibles produciéndose generalmente la analgesia antes que la anestesia.

Su estructura química es la de amina terciaria, cuyos grupos amino interactúan con grupos polares de la membrana celular nerviosa, reduciendo su permeabilidad y estabilizando el potencial de membrana.

La adrenalina es una amina biógena con actividad simpaticomimética sobre receptores tipo alfa y beta. Su administración local origina un potente efecto vasoconstrictor de vasos y arteriolas que disminuye la perfusión local, retrasando la velocidad de absorción de la lidocaína. Dicho efecto consiste en la inhibición de la generación y propagación de los impulsos nerviosos por bloqueo de los canales de sodio voltaje-dependientes de la membrana nerviosa. La asociación de la adrenalina a un anestésico local (lidocaína) modifica la absorción, difusión y potencia de la lidocaína, prolongando su efecto.

En caballos se ha observado el comienzo del efecto anestésico entre 5-15 minutos. El efecto máximo ha sido observado entre 60-90 minutos y la duración del efecto promedio hasta 6 horas (en algunos individuos se observó hasta 9 horas). En gatos por la vía epidural el comienzo de la parálisis de la parte trasera se observó a los 2 minutos con una duración de 100 minutos y la pérdida de reflejo comenzó a los 5 minutos con una duración de 60 minutos.

5.2. Datos farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos calculados difieren en cierta medida en función de la especie, pero se puede deducir de los datos obtenidos que el T_{max} está entre 1-60 minutos y el T_{1/2} entre 1 y 96 minutos cuando la lidocaína se administra por vía epidural, intravenosa o por infiltración.

6. DATOS FARMACÉUTICOS

6.1. Lista de excipientes.

Clorobutanol hemihidratado.

Cloruro de sodio.

Agua para preparaciones inyectables.

6.2. Incompatibilidades.

No se han descrito.

6.3. Periodo de validez.

Periodo de validez del medicamento veterinario acondicionado para su venta: 3 años.

Periodo de validez después de abierto el envase primario: Uso inmediato.

6.4. Precauciones especiales de conservación.

Conservar a temperatura inferior a 25°C.

Proteger de la luz y en lugar seco.

6.5. Naturaleza y composición del envase primario.

Frasco de vidrio neutro, topacio, tipo II, de 100 ml de capacidad, cerrado con tapón elastómero y sellado con cápsula de aluminio.

Formatos: Caja con un frasco de 100 ml. Código Nacional: 575963.0

6.6. Precauciones especiales para la eliminación del medicamento veterinario no utilizado o, en su caso, los residuos derivados de su uso.

Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con la normativa vigente.

7. TITULAR DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN.

LABORATORIOS OVEJERO, S.A.

Ctra. León-Vilecha, nº 30

24192 LEÓN

8. NÚMERO DE AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

Número de autorización de comercialización antiguo revocado: **4.837 NaI**

Nuevo número de autorización de comercialización: **2.203 ESP**

9. FECHA DE LA PRIMERA AUTORIZACIÓN O FECHA DE LA RENOVACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN

20 de octubre de 2010

10. FECHA DE REVISIÓN DEL TEXTO

20 de octubre de 2010

PROHIBICION DE VENTA, DISPENSACIÓN Y/O USO

Condiciones de dispensación: **Medicamento sujeto a prescripción veterinaria.**

Condiciones de administración: **Administración exclusiva por el veterinario.**