

CAPÍTULO XIX

MEJORA DEL BOVINO LECHERO MEDIANTE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DENTRO DE NÚCLEOS MOET

I INTRODUCCIÓN.

II METODOLÓGICAS

III RESULTADOS

IV USOS Y UTILIDADES DE LAS TÉCNICAS.
SITUACIÓN ACTUAL

V LITERATURA CITADA

Julio de la Fuente Martínez

I. INTRODUCCION.

El principal objetivo de un rebaño lechero es aumentar los kilos de leche, grasa y proteína que pueden ser producidos en cada lactación por un animal dentro de su medio ambiente. Para conseguir incrementar y/o mantener el nivel de producción de los descendientes de los animales actualmente en producción, como primera medida hay que determinar con exactitud sus producciones y con la ayuda de la información genealógica determinar los índices genéticos. Estos índices aportan una predicción de la capacidad de producción de un animal determinado, así como de la probabilidad de transmisión a sus descendientes de esa capacidad de producción.

Cuando las condiciones de manejo permiten la suplementación de la ración con alimentos concentrados se puede establecer una especialización en la producción hacia la carne o hacia la leche. No obstante, y aún incluso en rebaños altamente especializados siempre hay una producción complementaria a la especialización; en rebaños de leche la producción de terneros y de terneras que no son para reposición propia; y mas importante aún en rebaños de carne, la producción láctea para el amamantamiento. Así pues no hay que olvidar el hecho de la constante presencia del doble propósito, aunque los pesos específicos de cada una puedan tener porcentualmente un mayor o menor valor, según las condiciones de explotación.

Una vez identificados los animales genéticamente superiores hay que tratar de reproducirlos y para ello a través de los años se han ido desarrollando técnicas de reproducción asistida con el único fin de potenciar la utilización y difusión de los genes mejoradores.

La reproducción asistida en los bóvidos tiene su origen en el descubrimiento del espermatozoide en el líquido seminal por Ham en 1677 (44). Posteriormente la innovación metodológica que permitió la verdadera difusión y utilización de la IA a escala mundial fue la aportada por Polge y Rowson en 1952 (74), quienes al incluir el glicerol en el diluyente de conservación del esperma consiguieron su congelación sin excesiva pérdida de la capacidad fecundante. Mediante el uso generalizado de esta tecnología se ha facilitado una rápida y gran difusión de los toros genéticamente superiores a través de la Inseminación Artificial (IA).

La manipulación de los primeros estadios del desarrollo embrionario de los mamíferos se inició con los trabajos de W. Heape en 1890 (49). Desde aquel primer trabajo los objetivos y finalidades han sido muy varia-

dos; desde los estudios puntuales para el esclarecimiento de los fenómenos fisiológicos y el incremento de las producciones animales, hasta la multiplicación y conservación de especies en peligro de extinción. Las experiencias realizadas en este area han servido como modelo biológico para la extrapolación de los resultados a la reproducción asistida humana. Sin embargo después de conseguida la congelación de los embriones bovinos por Wilmut (89), en las últimas décadas son los aspectos productivos los que han proporcionado un mayor impulso y desarrollo de las técnicas de manipulación embrionaria y es en el ganado lechero donde más se han desarrollado y difundido. Con el fin de aprovechar la vía hembra se desarrollaron las técnicas de manipulación y Transferencia de Embriones (TE), cuya difusión y utilización es reconocida en la practica totalidad de los países con ganaderías desarrolladas de alta producción y se va implementando en aquellas que desean una mejora productiva de sus rebaños.

En el momento actual y para tratar de evitar los problemas insolubles originados por la gran variabilidad en la respuesta superovulatoria de las hembras donantes, se han desarrollado una nueva serie de biotecnologías reproductivas encaminadas a la producción masiva in vitro de embriones bovinos, agrupadas bajo el nombre genérico de Fertilización In Vitro (FIV). Los primeros trabajos realizados sobre maduración in vitro de ovocitos bovinos se remontan al año 1965 (27), pero es en el año 1981 cuando Brackett (10) obtiene el primer ternero nacido a partir de ovocitos madurados in vitro y producido mediante FIV.

En numerosos países (Inglaterra, Canadá, Dinamarca, Alemania, Holanda y España entre otros) se han implementado los denominados grupos de Ovulación Múltiple y Transferencia de Embriones (MOET) (60) con el objeto de acelerar e incrementar la selección y mejora genética tanto en ganado de carne como de leche. Existen en la actualidad diferentes modelos de MOET según el tipo de animales implicados, adulto o juvenil, así como según la procedencia de los embriones, abierto o cerrado (3). Cualquiera que sea la estructura de los grupos MOET estos ofrecen un medio eficaz para mejorar rápidamente las producciones de una ganadería pura o mestiza, y así aplicando las metodologías reproductivas (TE y FIV) dentro de ganaderías especializadas y con animales de alta calidad genética, se puede llegar a constituir un núcleo de difusión de genes mejoradores para otras ganaderías menos productivas (a través de la IA y de la TE), ya que según Vaccaro (83): a pesar de la dificultad para efectuar las pruebas de progenie

en el clima tropical, no debe ser problemática la selección de vacas élite a usar como madres de futuros sementales.

II. METODOLOGIAS

Las principales metodologías involucradas en los grupos MOET son la IA y la TE, aunque en la actualidad también la FIV está tomando un gran auge. Otras tecnologías como la partición y el sexage de los embriones pueden ser eventualmente utilizadas en circunstancias y situaciones concretas.

2.1. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

La TE es una técnica reproductiva que básicamente consiste en la deposición de un embrión (en sus primeros estadios de desarrollo) recuperado del tracto genital de una hembra (donante) en el de otra (receptora) para su posterior gestación y parto. Desde el punto de vista metodológico la TE es sencilla en su concepto pero compleja en cuanto a su realización, debido principalmente al gran número de factores que inciden sobre ella y la necesidad de una serie de pasos precisos y consecutivos, de cada uno de los cuales dependerá el éxito o fracaso final de la técnica.

Debido a los altos costes que implica su realización, resulta evidente que uno de los factores mas importantes a tener en cuenta es la elección de las hembras donantes. Para la selección de los animales donantes se han de seguir dos criterios consecutivos, el primero genético y el segundo reproductivo. Bajo el punto de vista genético es importante resaltar que la elección no debe ser realizada únicamente en función del nivel de producción de cada individuo, ya que no necesariamente este será transmisible a la descendencia. Por lo tanto, el único criterio fiable es el índice genético, el cual se obtiene en función de la producción láctea medida por el control lechero (los kilogramos de leche, proteína y de grasa producidos, desligando la parte ambiental de la parte genética o transmisible de la producción) y la genealogía.

Una vez elegidas las hembras genéticamente superiores se ha de realizar una nueva selección bajo el punto de vista reproductivo, para lo cual se han de tener en cuenta diferentes extremos, los mas importantes son:

- Ausencia de antecedentes patológicos anteriores como abortos, retenciones placentarias y quistes, ya que reducen la probabilidad de una producción óptima de embriones (43,41). Es deseable que los animales propuestos para la superovulación no presenten una media superior a las dos inseminaciones por gestación.

- Existencia de ciclicidad anterior a la superovulación: 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.

La preselección reproductiva intensa de los animales destinados a donar embriones es muy importante, pues disminuye la incidencia del número de hembras que no responden a los tratamientos superovulatorios y mejoran la respuesta media del número de embriones viables o transferibles de un programa de TE. Así mismo, es importante someter a los animales a una alimentación equilibrada y realizar el tratamiento urgente de infecciones y enfermedades metabólicas en el postparto, ya que pueden tener un efecto residual sobre la respuesta superovulatoria meses después.

- Superovulación de donantes:

El objetivo de los tratamientos superovulatorios es provocar en la hembra un elevado número de ovulaciones, con el fin de conseguir el máximo número de embriones fertilizados y desarrollados en un solo ciclo sexual. Este propósito puede ser conseguido mediante la utilización de diferentes hormonas gonadotropas, siendo las más utilizadas la gonadotropina coriónica equina (eCG), la gonadotropina menopáusica humana (HMG) y la hormona folículo estimulante (FSH), de la cual existen numerosos productos comerciales en el mercado que proceden de diversos orígenes. Generalmente se acepta que la estimulación con FSH resulta superior a la realizada con eCG (67,19), debido principalmente a su excesiva vida media. Para evitar este efecto pernicioso se han utilizado anticuerpos monoclonales anti-eCG, inyectados en el momento de la primera inseminación (26,21) con los que se consiguieron respuestas similares a las obtenidas con FSH. El factor limitante más importante que afecta a los resultados de la superovulación es la variabilidad individual en la respuesta superovulatoria a las gonadotropinas exógenas, 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 (46).

Otros factores que afectan a la superovulación son: la edad, el momento de la superovulación, el tipo de hormona y la dosis empleada, así como el lote de fabricación de algunas de ellas. La edad óptima para la superovulación (en ganado Holstein) se sitúa en los 3-4 partos, descendiendo la respuesta embrionaria tanto en cantidad como en calidad a medida que aumenta la edad, encontrándose el punto de inflexión en los diez años, después de los cuales las respuestas comienzan a descender progresivamente a gran velocidad (59,51). La superovulación se ha de comenzar durante la fase luteal del ciclo sexual. Actualmente, mediante técnicas ecográficas se han podido poner de manifiesto los cambios ováricos en el ciclo sexual y durante la superovulación (31), evidenciándose una correlación entre el número de folículos medianos y el de los embriones recogidos. De igual manera se ha puesto de evidencia que la existencia de un folículo dominante al inicio de la estimulación reduce significativamente la respuesta superovulatoria obtenida. Existen diferentes caminos para controlar el desarrollo folicular, hasta el momento actual se han empleado diferentes técnicas para eliminar el efecto depresivo del folículo dominante sobre la superovulación. La electrocauterización del folículo dominante durante su fase de crecimiento (2) y la aspiración transvaginal ultrasonográfica (6) son seguidas por una descarga de FSH endógena y por la emergencia de una nueva oleada de crecimiento folicular 1.5 a 2 días después del tratamiento. Los tratamientos con hCG (75) o con GnRH (65) han demostrado ser capaces de inducir luteinización folicular y ovulación, seguidos de una nueva oleada folicular. Los tratamientos con progesterona se ha demostrado que son capaces de suprimir el crecimiento folicular de forma dosis dependiente y de inducir así mismo un nuevo desarrollo folicular (1,14). La administración exógena de estradiol induce atresia folicular y suprime la secreción gonadotrófica, especialmente cuando es administrado en la fase luteal (9). Los estudios realizados con la utilización conjunta de implantes de progestágenos y estradiol sobre la dinámica folicular han mostrado que el estradiol exógeno suprime el crecimiento del folículo dominante, cualquiera que sea el estado folicular (de crecimiento, estático o regresivo) y que además es seguido de forma consistente por el reinicio de un nuevo crecimiento folicular que en promedio aparece en 4.3 días posteriores (7).

- Manipulación de embriones:

La mayoría de los procesos de recogida, manipulación y transferencia de los embriones eran muy complejos hace dos décadas, actualmente se

han simplificado de tal manera que después de un entrenamiento adecuado pueden ser realizados de forma rutinaria.

Una vez inseminadas las hembras donantes, entre el sexto y octavo día se procede a la obtención de los embriones producidos, ya que antes de este momento algunos embriones pueden permanecer aún en los oviductos (69). Después de recuperado el medio de lavado los embriones deben ser aislados del volumen total, utilizando diversos métodos de filtración y drenaje, para poder realizar su evaluación morfológica y así poder determinar su utilización posterior. Según los criterios descritos por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) los embriones han de ser catalogados de acuerdo a su estadio de desarrollo, nombrándoles del 1 (estadio de una célula) al 9 (estadio de blastocisto eclosionado), y según su calidad: excelente (=1), bueno (=2), regular (=3) y degenerado (=4).

Una vez que se ha realizado el diagnóstico morfológico y se han determinado los embriones capaces de proseguir su desarrollo, se puede proceder a su manipulación, para posteriormente ser transferidos a hembras receptoras. En la actualidad, en condiciones de campo, se puede llevar a cabo la congelación y partición de los embriones. Cuando se dispone de un laboratorio adecuado se puede determinar el sexo (82).

- Conservación:

Los embriones pueden ser conservados a bajas temperaturas (0-4 °C) sin que se aprecie una pérdida de viabilidad en las primeras 24 horas, decreciendo en un 50% a las 48 h. y haciéndose nula a las 120 h. (61). Por lo tanto, sin duda alguna la congelación es la metodología de elección para la conservación y transporte a largas distancias.

Antes de ser congelados los embriones han de ser protegidos con crioprotectores que eviten la formación de cristales intracelulares durante su enfriamiento. La velocidad de congelación y la temperatura de inmersión son variables estrechamente correlacionadas, de modo que el descenso lento de la temperatura (0.3° - 0.5 °C/min) permite realizar la inmersión en nitrógeno líquido a temperaturas comprendidas entre los -30° a -40 °C, de tal forma que sea posible la descongelación rápida de los embriones (~500 °C/min) de manera similar a la realizada con el semen (77,78). Para conseguir velocidades rápidas de congelación, se utilizan altas concentraciones de crioprotectores (3 molar) que permitan lograr reducciones drásticas del volumen celular a temperatura ambiente, semejantes a las conseguidas mediante el descenso progresivo de la temperatura (64). Este proceso es el denominado vitrificación, en el cual las altas concentraciones de

crioprotectores solidifican durante el enfriamiento sin formar cristales de hielo (79,58). Hasta el momento los ensayos realizados con esta metodología han tenido un éxito reducido (85).

Para evitar el efecto tóxico que sobre los embriones ejercen los crioprotectores estos han de ser retirados lo mas rápidamente posible después de la descongelación. La retirada del crioprotector suele ser realizada en tres pasos, mediante la inclusión de los embriones en concentraciones decrecientes (6%, 3% y 0%) del mismo, complementadas con sacarosa 0.3 molar. La retirada del crioprotector con estos pasos obliga a la visualización bajo estereoscopio de los embriones descongelados, aunque actualmente se está imponiendo la utilización de crioprotectores que permitan la transferencia directa sin necesidad de extraer a los embriones de la pajuela en la que fueron congelados, de manera similar a como se realiza con el semen (55).

- Transferencia a receptoras:

La fertilidad es el diagnóstico más fiable de la viabilidad embrionaria, además de ser el objetivo último de cualquier técnica artificial de reproducción. En ella interfieren una serie de factores que conciernen al tipo de técnicas empleadas para la transferencia y sincronización entre donantes y receptoras, al embrión y a la receptora. El embrión, al ser transferido, ha de encontrar un ambiente uterino lo más similar posible al que le soportaba en el animal donante. El sistema utilizado para conseguir este propósito consiste en la sincronización de celos entre donante y receptora, tratando de hacer coincidir lo mejor posible el estadio de desarrollo embrionario con su correspondiente estado uterino. El margen de desequilibrio aceptable para que no represente un efecto adverso es de ± 1 día (80). Las receptoras pueden ser sincronizadas según los métodos tradicionales (prostaglandinas y/o progestágenos), resultando que a los animales a los que para su sincronización con la donante se les administró prostaglandina (PGF₂), presentaron porcentajes de gestación significativamente superiores a los que fueron utilizados tras la observación de un celo natural (47).

Las técnicas utilizadas para depositar los embriones pueden ser quirúrgicas y no quirúrgicas, determinadas por la vía de acceso al útero del animal receptor. La vía quirúrgica fue la primera que se utilizó con éxito por Willett en 1951 (88) operando por la línea media abdominal para acceder al tracto genital de la receptora. Posteriormente ha sido prácticamente abolida esta aproximación, debido a la necesidad de utilización de anestesia general, siendo mas frecuente la vía paralumbar, ya que solo requiere una tranquiliza-

ción y anestesia local en el lugar de la incisión. La vía no quirúrgica o transcervical consiste en atravesar el cuello uterino de forma similar a como se realiza en la IA. Inicialmente Mutter (68) demostró las posibilidades de esta vía al conseguir el primer nacimiento mediante su utilización. Actualmente, la vía transcervical se ha extendido alcanzándose con ella resultados similares a los obtenidos con la transferencia quirúrgica (20).

Debido a las relaciones entre embrión y ovario, los porcentajes de fertilidad se ven aumentados al depositar los embriones en el cuerno ipsilateral al ovario activo, llegando a incrementarse en un 50% el número de receptoras gestantes (80). La utilización de novillas como receptoras frente a vacas ofrece superiores tasas de gestación, mayor facilidad de manejo por su uniformidad y menor coste (11). Un buen estado corporal (3-3.5) y nutricional (equilibrio mineral), unido a un buen manejo de la receptora y la eficacia en la detección de celos son los factores que mas van a influir para obtener altas tasas de gestación. Un último factor a tener en cuenta en la transferencia a las receptoras es el factor humano, así al evaluar los resultados sobre 2.754 transferencias no quirúrgicas se han obtenido unos porcentajes de gestación entre el 20% y el 67%, siendo esta gran diferencia atribuida fundamentalmente a la habilidad de los distintos técnicos (47).

2.2. FERTILIZACIÓN IN VITRO.

La FIV parte de los gametos (ovulos y espermatozoides) que han de ser obtenidos del animal y llevados al laboratorio para una vez allí producir embriones en estadios y con la capacidad de desarrollo similares a los utilizados en la TE. Metodológicamente resulta una herramienta mas compleja técnicamente y con unos costes mucho mas elevados tanto en inversiones de infraestructura y equipamiento, como en formación y dedicación del personal altamente cualificado que requiere para su implementación.

Las metodologías simultaneas y/o correlativas que han de realizarse para poder producir embriones in vitro pueden sintetizarse de la forma siguiente:

- Obtención de ovocitos.

Los ovarios de la hembra bovina contienen gran cantidad de ovocitos cualquiera que sea su estado fisiológico reproductivo. El abastecimiento de ovocitos para su procesado en el laboratorio puede provenir de varias fuentes:

a) A partir de ovarios obtenidos en el matadero, donde los ovocitos son normalmente utilizados como material biológico para investigación, aunque en ocasiones también pueden provenir de animales especialmente valiosos que por una u otra razón han tenido que ser sacrificados.

b) La obtención de ovocitos a partir de animales vivos puede realizarse por endoscopia con anestesia general o por punción transvaginal ecográfica con anestesia epidural. Este último método fue descrito por Pieterse (73) y modificado por Kruip (54) permitiendo puncionar folículos de 3-8 mm de diámetro mediante la inserción transvaginal de una aguja guiada por ecografía. En ambos casos pueden o no realizarse estimulaciones ováricas previas a la obtención. Estos métodos abren la posibilidad de obtener ovocitos a partir de animales impúberes, desde las 4 semanas de vida por endoscopia según Amstrong en 1991 (4) y a partir de las 10 semanas de edad por ecografía y punción transvaginal según Brogliatti en 1995 (12,13), pudiendo producir a partir de ellos embriones transferibles y gestaciones.

El transporte de los ovarios hasta el laboratorio se lleva a cabo en solución salina tamponada a temperatura ambiente, pudiéndose conservar entre 25-30 °C durante varias horas sin que se vea afectada la capacidad de desarrollo posterior de los ovocitos. Una vez en el laboratorio los ovocitos son obtenidos junto con el líquido folicular del cual son separados por decantación (53,45).

- Producción in vitro de embriones bovinos:

Tres son las fases necesarias para la producción de embriones in vitro: maduración, fertilización y cultivo.

Maduración:

Una vez obtenidos los ovocitos a partir de los ovarios donantes se ha de proceder a su lavado y posterior clasificación morfológica, habitualmente según la nomenclatura numérica propuesta por Liebfried y First (56), atendiendo principalmente al aspecto del citoplasma, así como al número de capas celulares del cúmulus oophorus que los rodean y a su disposición.

La existencia de células del cúmulus favorece el desarrollo de los ovocitos inmaduros ya que facilitan la asimilación de aminoácidos y de otros nutrientes que en forma pasiva no atraviesan la zona pelúcida (66). Está demostrado de forma inequívoca que solo poseen capacidad para completar su desarrollo o maduración in vitro aquellos ovocitos que cuentan con un cúmulo completo y compacto (39). La maduración se realiza

durante 24 horas en estufa a 39 °C con 5% de CO₂ y máxima humedad relativa. El medio de cultivo de elección suele ser el TCM-199 (38). Como fuente de proteínas se puede utilizar suero fetal o de vaca en celo, se adicionan así mismo hormonas (LH,FSH y E₂B) para favorecer la expansión del cúmulo y por su contribución a la maduración citoplasmática.

Fertilización in vitro:

Al igual que los ovocitos lo espermatozoides han de sufrir un proceso de capacitación similar al que acontece después de la eyaculación en la vagina durante su progreso por el tracto femenino, desde el cervix hasta el oviducto donde se encuentra con el ovocito (16). Hoy día aún no se conoce en detalle el proceso de la maduración o capacitación espermática, aunque si se ha demostrado un aumento del metabolismo y por tanto de la motilidad espermática, unido a cambios en la composición de la membrana externa o capuchón cefálico del espermatozoide en el momento del contacto de estos con la zona pelúcida (76). La reacción acrosómica, durante la cual se funde la membrana y se forman vesículas, posibilita la liberación de las enzimas acrosomales que son las responsables del avance del espermatozoide a través de la zona pelúcida (86).

Después de la descongelación, la preparación inicial de los espermatozoides consiste en la selección de aquellos móviles mediante un gradiente de Percoll, por la realización de un swin-up (71) o por diversos medios de filtración para su posterior dilución hasta alcanzar una concentración óptima (habitualmente a 1×10^6 espermatozoides/ml). El proceso de fecundación desencadena el final de la división meiótica que culmina con la exclusión del segundo corpúsculo polar, posteriormente se produce la formación del pronúcleo masculino que aportará el 50% (n) de la dotación génica del futuro individuo. Las tasas de fertilización aceptadas oscilan entre el 70-90% de ovocitos penetrados y que muestren sus dos pronúcleos y la cola del espermatozoide. Para su determinación se procede a la fijación y tinción con una solución de orceina de una muestra de los ovocitos procesados. Tanto la concentración de los espermatozoides móviles como la de heparina han resultado ser toro-dependientes, ya que se aprecian grandes oscilaciones en los valores óptimos entre sementales (57), e incluso entre diferentes eyaculados de un mismo animal (52).

Cultivo in vitro:

En el momento actual el factor mas limitante para la optimización del proceso de producción de embriones bovinos in vitro radica en el período de cultivo posterior a la fertilización, esto es, la obtención de blastocistos

viables y por tanto susceptibles de ser transferidos de forma tradicional a hembras receptoras.

El principal problema metodológico planteado es atravesar el estado de bloqueo ya que el desarrollo *in vitro* sufre una interrupción en el estadio de 8-16 células. Para la superación de este bloqueo inicialmente fueron empleadas metodologías de cultivo *in vivo* (en la actualidad aun son empleadas por algunos grupos), cultivando los cigotos y/o los embriones de 2 células durante 4-6 días en oviductos de ovejas (18,28,62), de coneja (8,81,35) y de novilla (90). Estos métodos resultan muy complejos y costosos al tener que realizar complicadas cirugías para la deposición de los embriones en los oviductos y posteriormente sacrificar a los animales receptores para la recuperación de los embriones desarrollados. En adición el rendimiento no es muy elevado, ya que se han descrito pérdidas de hasta un tercio de los embriones transferidos. Debido a estas enormes limitaciones se desarrollaron sistemas de cultivo *in vitro* con suplementos de diversos tipos celulares, así el denominado co-cultivo se ha desarrollado en base a la utilización de células de la granulosa (40,5), del oviducto (35,29), del útero (87), con vesículas trofoblásticas (50) o adicionando distintos factores de crecimiento (36).

III. RESULTADOS

Los resultados obtenibles están en función del nivel de exigencia alcanzado en la selección tanto genética como reproductiva.

3.1. RESULTADOS REPRODUCTIVOS

La puesta a punto y utilización de las diferentes tecnologías reproductivas están condicionadas por las posibilidades de manejo de los animales en cada situación determinada. A pesar de existir una gran repetibilidad, los resultados alcanzados mediante su utilización son dependientes de factores externos tales como el tipo de animal, las condiciones de su crianza e incluso se ven altamente afectados por el factor humano (entrenamiento, experiencia, habilidad, etc.), sobre todo a la hora de la manipulación de los gametos y embriones (39,30).

- Resultados de la TE:

El principal problema que presentan los programas de superovulación en los grupos MOET, donde el número de los animales seleccionados es muy reducido, es la falta de respuesta al tratamiento superovulatorio de algunos animales. En concreto en nuestra experiencia se ha detectado una mayor ausencia de respuesta en las vacas adultas (26%) que en las novillas (12%), si bien en los animales que responden los promedios de embriones son muy similares, tanto para los embriones totales obtenidos a partir de vacas o novillas (8.1 vs 7.2) como de los embriones viables por colecta (4.3 vs 4.1) (34). La respuesta superovulatoria se ha visto igualmente modificada por el efecto negativo del lote de fabricación de la FSH-p utilizada, ya que después de analizar los datos de cuatro lotes de fabricación diferentes sobre 97 animales, la respuesta obtenida en cuanto al promedio de embriones viables recuperados ha sido de: 2.2 ± 0.6 ; 4.4 ± 0.7 ; $1.9 \pm 0.6^*$ y $4.9 \pm 0.9^*$ (*: P). Siendo aún mayores las diferencias estadísticas al analizar el promedio de embriones totales obtenidos por lote de fabricación (22).

Debido a la frecuente carencia de receptoras en el momento de la estimulación de las donantes, la mayoría de los embriones viables obtenidos son congelados para su futura transferencia. Al valorar la posibilidad de acortar los tiempos empleados en la TE (y por tanto optimizar los costes originados), se ha estudiado la posibilidad de disminuir el tiempo necesario para la congelación de los embriones al comenzar su congelación desde la temperatura de cambio de estado (-7°C), en lugar de iniciarla desde la temperatura ambiente (20°C). No se han encontrado diferencias en las tasas de gestación en función de la temperatura inicial de congelación: 52.6% (20/38) a -7°C frente a 52.9% (18/34) a 20°C (22).

El proceso de congelación-descongelación origina una tasa promedio de degeneración embrionaria del 18.4%, si bien el factor más relevante en esta pérdida viene dado por la calidad del embrión en el momento de la congelación. Así en aquellos embriones calificados de calidad excelente (=1) antes de la congelación solo el 11.6% (25/224) fue diagnosticado como degenerado después de la descongelación, mientras que de los de calidad buena (=2) se degeneraron el 40% (30/74) (P). Las gestaciones resultantes de los embriones viables post-descongelación en ambos grupos resultaron similares: 59% (108/183) y 53.8% (63/117) (21).

Una mención especial se hace necesaria en cuanto a la descongelación directa de los embriones congelados. Al comparar diferentes crioprotectores permeables se apreció un efecto beneficioso de la utilización de la

sacarosa (0.2M) al ser añadida al medio de congelación o de descongelación, al utilizar propilen-glicol (1.4M) como crioprotector, con resultados in vitro similares a los controles congelados en glicerol y descongelados en tres pasos decrecientes con adición de sacarosa (0.3M) (23). Al comparar este último sistema frente a la descongelación directa en 1M de sacarosa no se han apreciado diferencias en los porcentajes de gestación, resultando el 60% (65/108) novillas gestantes y 51% (27/53) gestaciones al descongelar en un solo paso (24).

Al analizar los resultados de gestación dentro de nuestro programa MOET se ha puesto de manifiesto una alta incidencia (16%) de pérdidas fetales, después de confirmada la gestación (60d) en los embriones importados (33). Estos resultados han sido posteriormente confirmados por Newcomb y Dicke (70) quienes incluso apreciaron una desviación de la proporción de sexos en los nacimientos (59.1% machos vs 40.9% hembras) en este mismo tipo de embriones. Esta pérdida preferencial de embriones hembras ha sido igualmente puesta de manifiesto después del cultivo in vitro de los embriones sometidos a micromanipulación (42).

- Resultados de la FIV:

La eficiencia de los programas de FIV suele ser medida en términos del número de blastocistos obtenidos a partir del número de ovocitos puestos en cultivo y fertilizados con un semen determinado. Existen grandes diferencias entre los distintos laboratorios no solo por el origen de los ovocitos y por las diferentes metodologías de cultivo y manipulación de los ovocitos en cada laboratorio, sino también en la selección de los ovocitos puestos en cultivo y el uso de diferentes toros y de diferentes eyaculados. Todo esto hace que los resultados publicados varíen entre el 15 y el 40% de blastocistos obtenidos (para revisión: 39).

A la vista de estos bajos resultados actuales, resulta de gran importancia poder obtener el mayor número de ovocitos de un animal determinado, en el menor tiempo posible. El número de ovocitos obtenidos por aspiración transvaginal prácticamente se dobla cuando las aspiraciones son realizadas dos veces por semana frente a los programas en los que solo se aspira a los animales una vez por semana (84).

Gibbons (37) ha obtenido un promedio por vaca aspirada de 9,7 ovocitos por sesión, alcanzando un desarrollo embrionario in vitro superior en los ovocitos obtenidos por aspiración transvaginal (40,8%) frente a los obtenidos a partir de ovarios de matadero (30%), lo cual sugiere una mayor calidad de los ovocitos recuperados in vivo. Al realizar una comparación

de los blastocistos obtenidos al aspirar de animales vivos se ha obtenido un 11-16,4% en novillas y 21,6-24,4% en vacas lo cual manifiesta una ligera superioridad de las vacas frente a la novillas, apreciándose que el número de blastocistos obtenidos por sesión de aspiración en las vacas fue en promedio de 1,6 y de 0,8 para las novillas (25).

Los resultados obtenidos al transferir en fresco embriones producidos *in vitro* varían del 41 al 56% según la edad del embrión (48). Estos resultados se sitúan en un 10% por debajo de los obtenidos en estos mismos laboratorios con embriones producidos *in vivo*. No obstante el factor más limitante lo representa la eficiencia en la congelación de los embriones producidos *in vitro*, que según Hasler (48) se sitúa para los blastocistos de 7 días en el 42% (de 67 TE) y del 20% (de 30 TE) con embriones de 8 días, lo cual por el momento provoca un considerable descenso de la aplicabilidad de las tecnologías descritas.

- Comparación de los resultados obtenidos *in vivo* vs *in vitro*:

Resulta evidente la ventaja adicional que representa la obtención de ovocitos por medio de aspiración en animales problema, esto es, en animales que han producido pocos o ningún embrión mediante los tratamientos de superovulación tradicionales. Dentro de los grupos MOET para acelerar los programas de mejora genética tanto por el número de embriones obtenidos de un animal, por la posibilidad de reproducir animales impúberes, como por el número de toros que pueden ser utilizados con una misma hembra.

Existe una gran diferencia a favor de la TE tradicional tanto en los equipos necesarios como en la especialización del personal encargado de su realización, sin embargo se aprecia un incremento considerable en el número de embriones obtenidos al evaluar un período largo de tiempo (1 año) a favor de la aspiración y la FIV (Cuadro I), que puede llegar a compensar las diferencias mencionadas.

Cuadro I. Optimización de la producción de embriones bovinos

	IN VIVO	IN VITRO
EMBRIONES/TRATA.	4.9 (0-10)	0,9 (0-8)
TRATAMIENTOS	3-4/año (1-6)	2/semana
EMBRIONES/AÑO	±21	± 80

3.2. RESULTADOS GENÉTICOS

Cuando se dispone de un control de rendimientos fiable y riguroso, resulta relativamente sencillo poder identificar los animales genéticamente superiores para uno o varios caracteres determinados (como ejemplo el TPI de USA o el Índice Compuesto -ICO- en España). A partir de los datos obtenidos de los animales a través del control se puede jerarquizar a la población, haciendo comparaciones entre distintas ganaderías y dentro de la propia explotación. Una condición indispensable para el buen funcionamiento del sistema es que los datos recogidos sean procesados rápidamente y estén a disposición de los ganaderos tan pronto como sea posible, con el fin de que este pueda tomar decisiones objetivas en sus animales sobre el manejo, cubriciones, reposiciones, etc.

Los datos genéticos disponibles en la actualidad de los cinco grupos MOET en España, se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro II. Índices genéticos y de pedigrees para los ICO-P en el año de nacimiento

Año	1992	1993	1994
Madres USA	2.340	2.680	2.936
Pedigree emb. USA	2.360	2.589	2.811
Pedigree emb. ELITE			2.401
Pedigree emb. CAPV	1.739	1.674	1.929
1% Mejor CAPV	1.489	1.519	
Madres CAPV	1.040	1.065	1.476

CAPV: Comunidad Autónoma del País Vasco

IV. USOS Y UTILIDADES DE LAS TÉCNICAS. SITUACION ACTUAL

Las diferentes tecnologías reproductivas (IA, TE, OPU, FIV, etc.) pueden ser utilizadas prácticamente sobre cualquier animal sano y aún en condiciones extremas, pero su correcta aplicación y mejor aprovechamiento está limitada por las posibilidades que cada sistema de producción puede ofrecer.

4.1. USOS Y UTILIDADES

La TE es (después de la IA) la tecnología reproductiva mas importante para conseguir la mejora genética de las explotaciones, esto es, para lograr el incremento de las producciones y la reducción de los costes de producción, al proveer al ganadero de animales de mayor calidad. En adición la TE tiene un enorme potencial en la prevención de la transmisión de enfermedades por el transporte de animales vivos. Facilita la posibilidad de adquirir los patrimonios genéticos de élite mundial de una raza (por ej. Holstein Freisian), y así poder disponer de las crías nacidas como futuros reproductores en los programas de mejora del propio país. Dentro de esta estrategia, los machos son criados con el objetivo de ser utilizados en los programas de testaje en descendencia, mientras que las hembras pueden ser utilizadas como madres de futuros sementales. Aunque la vía macho es la que mas progreso genético global representa, en las explotaciones comerciales de vacuno lechero es la vía hembra la mas utilizada y la que mayor actividad total de TE representa, obteniéndose importantes progresos genéticos con la superovulación de vacas o novillas con índices genéticos o de pedigree comprendidos entre el 1% mejor de la población. Con la misma herramienta de la TE es también posible introducir patrimonios genéticos nuevos o fundacionales ya desaparecidos de una zona o país determinado, como es el caso de las razas rústicas o indígenas europeas.

Las principales limitantes para una completa aplicación y difusión generalizada del potencial de la TE radican en el reducido número de hembras con la excepcional calidad genética necesaria para ser donantes de embriones. En adición, y según los resultados de campo obtenidos en los últimos años por el Grupo Reproducción del CIT-INIA, se aprecia una gran variabilidad individual en la respuesta de los animales a los tratamientos superovulatorios, donde 1 de cada 4 animales no responden, y aquellos que lo hacen donan un promedio de solo 4 embriones transferibles por tratamiento. Esto hace que en algunos animales genéticamente superiores (en ocasiones los mas valiosos) no pueda obtenerse el rendimiento medio requerido de por lo menos dos gestaciones (un macho y una hembra) por estimulación.

En la situación tecnológica actual resulta imposible la disminución de los costes de la TE, y muy difícil incrementar el número de embriones transferibles por estimulación, para así poder distribuir los costes sobre un número mayor de gestaciones. Por lo tanto, para intentar obtener mas em-

briones y consecuentemente reducir el coste por embrión, no hay otro camino que introducir nuevas tecnologías, abandonando parcialmente la superovulación de las donantes. Así pues y para evitar los problemas anteriormente citados, desde un punto de vista productivo se ha desarrollado la técnica de la FIV, cuyo objetivo es conseguir un mayor número de embriones de los que en la actualidad se pueden producir. Salvo algunos casos excepcionales, como es la conservación de animales en peligro de extinción, en general la FIV se utiliza para:

- Incrementar la producción de embriones viables obtenidos de las hembras donantes de élite. Los ovocitos de estas hembras han de ser fertilizados con el semen de alguno de los mejores machos a nivel mundial, para obtener un progreso genético adecuado.

- Fertilizar ovocitos obtenidos de terneras impúberes, de 1 a 12 meses de edad, con la finalidad de acortar el intervalo generacional y por tanto acelerar el progreso genético.

- Recuperar animales infértiles, ya que es la condición que causa una mayor pérdida económica en las ganaderías, especialmente cuando los individuos son de alto valor genético y de una mayor producción de leche.

4.2. ESTADO ACTUAL.

Desde hace una serie de años la Asociación Europea de Transferencia de Embriones (AETE) recopila (entre sus asociados de los diferentes países europeos) las estadísticas anuales en cuanto al número de vacas superovuladas (N.ANIM.), embriones viables obtenidos (E.VIA.) y de embriones transferidos, tanto en fresco (E.T.F.) como congelados de origen nacional (E.T.CN.) o de importación (E.T.CI.). La actividad en TE en Europa en los últimos años (1988-1994) se expone en el cuadro siguiente:

Cuadro III. Evolución de la TE en Europa

	N.ANIM.	E. VIA.	E.T.F.	E.T.CN	E.T.CI	TOTAL
1988	11.754	61.171	30.453	17.915	5.483	53.851
1989	18.145	94.537	42.225	31.710	5.160	79.092
1990	21.577	109.240	52.671	49.950	9.3951	12.006
1991	22.043	110.202	52.505	44.057	7.716	104.278
1992	20.022	99.744	43.828	38.287	5.624	87.739
1993	18.158	93.298	40.133	40.401	3.760	84.294
1994	22.557	115.718	48.402	49.389	5.096	102.887

La distribución por especialidad productiva se inclina a favor de la producción de leche con un 64% (de raza Holstein el 48%) de los animales lavados y de razas de producción de carne el 36% (de raza Charolaise el 10%).

Las variaciones acontecidas entre los dos últimos años (1993/94) han sido de un incremento del 4.7% para el número de donantes lavadas, de +6.4% del número de embriones transferibles y de +6.6% del número de embriones transferidos, lo cual representa un relanzamiento de la actividad que iguala el pico obtenido en el año 1991. En relación al número de animales estimulados, España está situada en el noveno lugar dentro de los países europeos, manteniendo unos niveles porcentuales de embriones recogidos por animal y de embriones viables similares a los de otros países superiores en número de actuaciones. Durante el año 1994 sobre 479 animales lavados se transfirieron 596 embriones en fresco, 640 embriones congelados de origen nacional y 423 de importación. Actualmente existen en España 14 equipos de TE y 5 de ellos trabajan con vacuno de carne.

V. LITERATURA CITADA

1. Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ. 1992. Effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J Reprod Fertil*; 95:627-640.
2. Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci*; 30:259-271.
3. Alenda R. 1986. Mejora Genética. Monografía Bovis Nº 13 y 14. Luzan 5. Madrid.
4. Armstrong D, Holm P, Stubbing S y Seamark. 1991. Laparoscopic aspiration and in vitro maturation of oocytes from calves. *Theriogenology* 35, 182.
5. Berg V, y Brem G. 1989. In vitro production of bovine blastocyst by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture. *Zuchthyg.* 24, 134.
6. Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 42:895-907.
7. Bo GA, Adams GP, Pierson RA and Mapletoft RJ. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43:31-40.
8. Boland M. 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriog* 21, 126.
9. Bolt DJ, Scott V, Kiracofe GH. 1990. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and GnRH treatment in ovariectomized beef heifers. *Anim Reprod Sci*; 23:263-271.

10. Brackett B, Bousquet D, Boice M, Evans I y Dressel. 1981. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol.Reprod*, 27, 147.
11. Broadbent P, Stewart M and Dolman D. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriog.* 35, 125.
12. Brogliatti G, De la Fuente J, Bergfelt D and ADAMS G. 1995. Ovarian dynamics subsequent to ultrasound-guided follicle ablation in prepuberal calves. XI Sci. Meeting AETE. Hannover. 138.
13. Brogliatti G, Swan C y Adams G. 1995. Transvaginal ultrasound-guided oocyte collection in 10 to 16 weeks of age calves *Theriogenology* 43, 177.
14. Burke CR, Macmillan KL and Roche JF. 1994. Some effects of prematurely elevated concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the estrous cycle in heifers. *Anim Reprod Sci.* 35:27.
15. Callesen H, Bak, Greve T. 1993. Spontaneous vs induced estrus in recipient cattle prior to non-surgical transfer of fresh or frozen /thawed embryos. 9 Sci. Meeting AETE.176.
16. Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tube. *Nature.* 168. 697.
17. Chupin D, Cognie I, Combarous R, Procureur R and Saumande J. 1988. Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. IN: *Follicular growth and ovulation rate in farm animals.* Martinus Nijhoff. 63.
18. Crister E, Leibfried M, Eyestone W y First NL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology* 25, 150.
19. De La Fuente J, Cocero M, Lopez A y Barragan C. 1988. Efecto de la utilización de distintas gonadotropinas exógenas sobre la cantidad y calidad de los embriones producidos por la hembra vacuna. ITEA 79,3
20. De La Fuente J, Monge A, Cocero M y Barragan C. 1989a. Resultados de gestación de embriones bovinos transferidos por vía quirúrgica y transcervical. *Med. Vet.* vol.6, No.1 19.
21. De La Fuente J, Monge A, Cocero M y Barragan C. 1989b. Producción y conservación de embriones vacunos. IV Congreso Internacional de Reprod. Anim. e I.A. León. p.58.
22. De la Fuente J. 1990. Transferencia de embriones en ganado vacuno. I Cong. Inter. de Medicina Bovina. Madrid. 51.
23. De la Fuente J, Fuentes S, Ugarte. 1993. One-step in vitro embryo thawing. IX Sci Meeting AETE. Lyon. 188.
24. De la Fuente J. Fuentes S, Ugarte C. 1995. Pregnancy rates of one-step thawed MOET embryos. XI Sci Meeting AETE. Hannover. 154.
25. Den Daas N y Merton S. 1994. In vitro embryo production, its use. X Meeting AETE: 117.
26. Dieleman S, Bevers M and Willemse A. 1989. Improved embryo yield and conditions of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered after the LH peak. *Theriogenology.* 31, 473.
27. Edwards J. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig and human ovarian oocytes. *Nature,* 208, 349.

28. Eyestone W, Leibfried M, Gilligan y First NL. 1987. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* 28, 1.
29. Eyestone W y First NL. 1989. *Early Embryo Development and Paracrine Relationships*. A.R. Liss. N.Y.
30. Farin P, Britt J, Shaw W, Slenning B. 1995. Agreement among evaluators of bovine embryo embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*. 44. 339.
31. Fortune J, Sirois J and Quirk S. 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29, 95.
32. Fuentes S, Payas A, Ugarte C, Montoro L y De La Fuente J. 1991. Tasas de gestación en el programa de TE del País Vasco. Resultados preliminares. ITEA vol 11, tomo I, 73.
33. Fuentes S, Payas A, Ugarte C y De La Fuente J. 1992. Pregnancy rates of bovine deep frozen and imported embryos. VIII Sci. Meeting AETE. Lyon. 158.
34. Fuentes S, Payas A, Ugarte C y De La Fuente J. 1993. Establecimiento de grupos de superovulación y transferencia de embriones (MOET) en el País Vasco. ITEA. 12. 403.
35. Fukui Y. y Ono H. 1988. In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilized oocytes. *Vet Rec* 122, 282.
36. Gandolfi F. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology*. 41. 95.
37. Gibbons J, Krister R, Pearson R. y Gwazdauskas F. 1994. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 43, 1129.
38. Gordon I. 1990. In vitro maturation (IVM) and fertilitation (IVF) of cattle ova. *ET Newsletter* vol. 8, n. 3, 6.
39. Gordon I. 1994. *Laboratory production of cattle embryos*. CAB International. Oxon. UK.
40. Goto K, Kajihara, Koba y Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertiliation of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 83, 753.
41. Greve T. 1982. Embryo transplantation in dairy cattle: An attempt to analyze factors that may affect embryo number and quality. In: II World Confer. on ET and IVF. Eds.: C. Merieux, M. Boneau, 251.
42. Gutiérrez A, Pintado B, Fuentes S. and De la Fuente J. 1993. Influence of micromanipulation and in vitro culture in the sex dependent loss of embryos. IX Sci. Meeting AETE. Lyon. 206.
43. Ham. Citado por Afcelius B' y Baccetti B. 1991. *History of spermatology*. Serono Symp. Raven Press. NY. 1.
44. Hahn J, Baumgartner G, Lotthammer K, Lorrman W, Schneider U, Traub J and Zoder H. 1977. Experiments to improve results of ova collection and transfer in cattle by preselection of donors and recipients. *Zuchthyg.* 12, 68.
45. Hamano S, Kuwayama M. 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison of cutting and aspiration method. *Theriogenology* 39, 703.

46. Hasler J, McCauley A and Foote R. 1983. Superovulation responses of Holstein cows. *Theriogenology* 19, 83.
47. Hasler J, McCauley A, Lathrop W and Foote R. 1987 Effect of donor-recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27, 1, 139.
48. Hasler J, Henderson W, Jin Z, Neely B, Stokes J y Trimmer S. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43, 141.
49. Heape W. 1890 Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc. Royal Society of London*, 48, 457.
50. Heyman Y, Camous S, Menezo Y Chesne P. 1987. In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27, 59.
51. Holm P, Greve T and Willeberg P. 1987. Description and analysis of factors influencing the response of 449 superovulated donors cows and heifers. *Theriogenology*. 27. 238.
52. Iritani A, Utsumi K y Yamaguchi K. 1986. Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa. *Dev. Growth Differ.* 28.45
53. Katska L. 1984. Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Anim Reprod Sci.* 7, 461.
54. Kruij AM, Boni R, Wurth Y and Pieterse M. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding cattle. *Theriogenology*; 42.675.
55. Lange H. 1995. Cryopreservation of bovine embryos and demi-embryos using ethylene glycol for direct transfer after thawing. *Theriogenology*. 43. 258.
56. Liebfried M y First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their viability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48, 76.
57. Liebfried M, Crister C, Parrish J y First NL. 1987. Developmental potential of bovine oocytes matured in vitro and in vivo. *Biol.Reprod* 36, 376.
58. Leibo S. 1989. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 31, 1, 85.
59. Lerner S, Thayne W, Baker R, Henschen T, Inskeep E, Dailey R, Lewis P and Bucher R. 1986. Age, dose of FSH and others factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63. 176.
60. Lohuis MM. 1995. Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*. 43, 51.
61. Lindner G, Anderson G and Cupps P. 1983. Survival of bovine embryos stored at 4 C. *Theriogenology* 20:311.
62. Lu K, Gordon I, Gallagher M and McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* 121. 259.
63. Lu K, Gordon I y Gallager M. 1988. Production of cattle embryos by in vitro maturation and fertilization of follicular oocytes and their subsequent culture in vivo in sheep. *Theriogenology* 29, 272.

64. Massip A, Vander Zwalmen, Ectors F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27, 69.
65. Macmillan KL, Thatcher WW. 1991. Effects of an agonist of gonadotropin releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod*; 45:883-889.
66. Moor R. 1983. Current problems in Germ Cell Differentiation. N.Y.
67. Moor R, Kruip A, Green D. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation?. *Theriogenology* 21. 103.
68. Mutter L, Graden A and Olds D 1964 Successful non surgical bovine embryo transfer. *A.I. Digest*. 12, 3.
69. Newcomb R, Rowson L.E.A. and Trounson A. 1976 The entry of superovulated eggs into the uterus. In "Eggs transfer in cattle" C.E.E. Seminar. 1.
70. Newcomb R and Dike A. 1995. Observation of pregnancy rate, losses of established pregnancies and skewing of the sex ratio after the transfer of imported frozen bovine embryos. XI Sci. Meeting AETE. Hannover.214
71. Parrish J, Leibfried M, Crister C, Eyestone W y FIRST NL. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591.
72. Pawlyshyn V, Lindsell C, Braithwaite M and Mapletoft R. 1986. Superovulation of beef cows with FSH-P a dose-response trial. *Theriogenology* 25,1, 179.
73. Pieterse M, Vos P, Kruip Th, Wurth Y, Van Beneden Th, Willense A and Taverne M. 1991 Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35, 19.
74. Polge C and Rowson L.E.A. 1952 The storage of bull semen at low temperature. *Nature*, London 169. 626.
75. Rajamahendran R, Sianangama P. 1992. Effect of human chorionic gonadotropin on dominant follicles in cows: accessory corpus luteum formation, progesterone production and pregnancy rates. *J Reprod Fertil*. 95. 577.
76. Roldan ERS, Murase T and Shi Q. 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science*. 266. 1578.
77. Rall W., Reid D and Farrant J. 1980. Innocuous biological freezing during warming. *Nature*. 286. 511.
78. Rall W. and Polge C. 1984. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J. Reprod. Fertil*. 70:285.
79. Rall, W. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24, 387.
80. Seidel G.E. 1980. Critical review of embryo transfer procedures with cattle. In: *Fertilization and Embryonic Development "in vitro"*. Plenum Press.
81. Sirard M, Lambert R y Menard A. 1985. *J.Reprod.Fertil*. 75, 551.
82. Thibier M and Nibart N. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*. 43. 71.
83. Vaccaro R, Vaccaro L, Verde O. 1992. Selección de reemplazos en ganado de doble propósito. In: *Ganadería Mestiza de Doble propósito*. Ed.: C. González-Stagnaro. Pub. Astro Data. Maracaibo. Cap. V:91.
84. Van Der Schams A, Eyestone W y Boer H. 1991. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 35.288.

85. Van Der Zwalm P, Tovati K, Ectors F, Massip A, Beckers J and Ectors F. 1989. Vitrification of bovine blastocyst. *Theriogenology*, 31, 270.
86. Wassarman P. 1990. Mechanism of Fertilization: Plants to Humans. Springer Verlag.
87. Wiemer K, Amborski G, White K y Godke R. 1987. *Theriogenology* 27, 294.
88. Willett E, Black W, Casida L, Stone H and Buckner P. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ova. *Science* 113, 247.
89. Wilmut I. and Rowson 1973. Experiments on low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 93, 686.
90. Xu K, Greve T, Callesen H y Hyttel A. 1987. pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 81, 501.