

SUPEROVULACIÓN: ESTRATEGIAS, FACTORES ASOCIADOS Y PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA EN BOVINOS

Jiménez C¹

Clínica de la Reproducción
Facultad de medicina Veterinaria y de Zootecnia, Sede Bogotá
Universidad Nacional de Colombia

RESUMEN

La transferencia de embriones tiene su origen en los años cincuenta, pero solo hasta los setenta se consideró como una alternativa comercial. A pesar de llevar más de 30 años, las tasas de superovulación y de preñez no se han mejorado sustancialmente. El número de ovulaciones varía entre 0 y 40 y, además, un 30% de las vacas superovuladas no responden al tratamiento o producen muy pocos embriones de mala calidad. Los investigadores del área han tratado de disminuir esta variabilidad sin mucho éxito. Por otra parte, se ha mejorado mucho en el conocimiento del ciclo estral, lo cual ha permitido que los esquemas se lleven a cabo en menos tiempo y se logren manejar los protocolos en tiempo fijo. El propósito de esta revisión es discutir los factores que afectan las tasas de superovulación en las vacas donadoras de embriones, y las posibles estrategias para mejorarlas.

Palabras clave: superovulación, transferencia de embriones, bovinos, ciclo estral, embriones.

SUPEROVULATION: STRATEGIES, ASSOCIATED FACTORS, AND PREDICTION OF THE SUPEROVULATORY REPOSE IN COWS

ABSTRACT

Embryo transfer in cattle started to be explored in the 50's but only in the 70's was considered as a commercial alternative. Even though the technology has been around for more than 30 years, the superovulatory response and the pregnancy rate after transfer of the embryos have not improved substantially. The number of ovulations varies between 0 y 40 and additionally about 40% of the superovulated cows do not respond to treatment or produce very few embryos or bad quality embryos. Research in this area has been done to reduce this variability without much success. On the other hand, the studies have helped in the understanding of the bovine estrous cycle, allowing the improvement and implementation of better and shorter protocols to obtain embryos as well as to program fixed time embryo recoveries. The purpose of this review is to discuss the factors that can affect the superovulatory response of embryo donor cows and the different strategies available to improve this response.

Key words: Superovulation, embryo transference, cattle, estrous cycle, embryos.

1 cjimeneze@unal.edu.co.

En un programa de superovulación y transferencia de embriones están involucrados varios procesos. Dentro de ellos se encuentran:

- Factores externos que afectan la respuesta superovulatoria
 - Nutrición
 - Periodo del año o estación
 - Manejo
 - Semen
- Factores fisiológicos que afectan la respuesta superovulatoria
 - Especie, raza, edad, individuo, estatus fisiológico (lactancia), fertilidad
 - Dinámica folicular y características de las ondas foliculares
 - Mecanismos de superovulación
 - Factores farmacológicos
 - Tipo de FSH
 - Productos y potencia
 - Relación de FSH/LH presente en el preparado comercial y culmina con el éxito de la ovulación.
 - Dosis
 - Frecuencia de administración

- Protocolos: tradicional y en tiempo fijo
- Alternativas para mejorar la respuesta superovulatoria
- Sobreestimulación

FACTORES EXTERNOS QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA

Factores tales como periodo del año o la estación, la nutrición y el manejo, y el semen pueden afectar la respuesta superovulatoria de una manera directa o indirecta.

En un estudio donde se evaluaron embriones recuperados durante seis años no hubo efecto sobre el número de estructuras recuperadas ni por el año, ni por la estación ni por el mes, aunque sí hubo una diferencia significativa sobre la tasa de fertilización (1) (tabla 1).

El semen tiene un efecto muy importante sobre el número de embriones obtenidos. Si en un lavado se recuperan solamente oocitos o embriones de mala calidad, no solo se puede deber a la respuesta superovulatoria sino a la calidad del semen (2) (tabla 2a).

Tabla 1. Número de estructuras recuperadas y calidad de embriones en programas de superovulación entre 1980 y 1986 (adaptado de Hasler et ál.) (1)

Factor	N	Total de estructuras	No. embriones	Tasa de fertilización
Invierno	178	11,2	6,9	65 ^a
Primavera	171	11,1	6,3	61 ^b
Verano	187	9,2	6,4	42 ^b
Otoño	130	9,4	6,0	50 ^c

Tabla 2a. Efecto de calidad seminal sobre la tasa de fertilización y la calidad de embriones recuperados (adaptado de Chenoweth) (2)

Calidad seminal	Fertilización (%)	Embriones excelentes (%)
Excelente	82,1A	61,2 ^a
Bueno	67,6b	55,7b
Regular	58,3c	53,9c
Malo	51,8d	33,7d

También se debe considerar el momento de la inseminación. En un estudio en vacas Holstein (tabla 2b), se demostró que la tasa de fertilización es mayor si la inseminación se realiza 24 horas después de iniciado el celo, comparado con inseminaciones más tempranas (3). Estos datos soportan la práctica de inseminar las vacas cada doce horas mientras la vaca siga en celo.

FACTORES FISIOLÓGICOS QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA

La aplicación de sustancias que estimulan la superovulación sobrepasa los mecanismos inhibitorios fisiológicos que hacen que una vaca ovule uno o dos oocitos por cada ciclo. El éxito de este tratamiento está determinado por el estatus ovárico de la vaca al inicio del tratamiento superovulatorio, y los mecanismos fisiológicos y genéticos que afectan la respuesta superovulatoria. Se ha propuesto que la especie, la raza, la edad, el número de partos, el estado lactacional, la fertilidad de la vaca, el estatus sanitario,

incluso el individuo *per se*, deben ser considerados cuando se vaya a establecer un programa de transferencia de embriones.

ESPECIE Y RAZA

Muchos practicantes de transferencia de embriones sugieren que existe una variabilidad a la respuesta superovulatoria dependiendo de la especie. Sin embargo, Krininger III et ál. (4) reportan que tal diferencia no parece ser real (tabla 3). Faltarían estudios más significativos que corroboren esta creencia; además, como se ha mencionado, se deben ajustar los protocolos a cada circunstancia ya que factores de manejo, temperatura, edad etc., pueden dar una impresión errada de la dificultad de superovular una raza o especie en particular.

En cuanto a la raza, hay cierta información acerca de que ciertas razas no producen embriones tan resistentes como otros. Por ejemplo, los embriones congelados / descongelados de la raza Jersey presentan menores tasas de preñez que las demás razas (6).

Tabla 2b. Efecto del momento de la inseminación sobre la tasa de fertilización en vacas superovuladas (adaptado de Dalton et ál.) (3)

	IA 0h	IA 12h	IA 24h
Total de estructuras	195	207	127
Tasa de fertilización (%)	29a	60b	81c

P<0,01

Tabla 3. Comparación de la respuesta a la superovulación con FSH entre vacas Brahman y Holstein (4) revisado por Guzmán (5)

	Brahman	Holstein
Tasa de ovulación	15,2±4,14	16,6±4,14
Embriones recuperados	9,3±2,93	10,9±2,93
Embriones recuperados (% de ovulación)	66,0±9,6	69,0±9,6

EDAD Y ESTADO DE LACTANCIA

En el estudio de Hasler et ál. (1) se reportó que las tasas de preñez de embriones transferidos de vacas mayores de 15 años eran más bajas (tabla 4a).

En otro estudio, donde se evaluó la calidad de los embriones obtenidos, se encontró que las vacas Holstein lactantes produjeron un porcentaje menor de embriones de buena calidad comparado con vacas no lactantes o con novillas (7). Similarmente, en otro (8), se observó un mayor número de embriones de mejor calidad en vacas no-lactantes que en vacas lactantes (tabla 4b).

FERTILIDAD DE LA VACA

En un estudio se analizaron registros de 1.000 donadoras de la raza Holstein. Los registros se dividieron entre dos grupos: vacas con buena fertilidad y vacas con baja fertilidad. Las vacas con buena fertilidad produjeron embriones más viables y con mejores tasas de preñez que las vacas de baja fertilidad (68 frente a 58%). Estos datos de todas formas hablan en favor de superovular vacas con historia de fertilidad regular o mala, pues si se obtienen embriones, éstos nos pueden dar una tasa de preñez aceptable al ser transferidos a receptoras sanas (1).

Tabla 4a. Efecto de la edad sobre el número de embriones producidos (adaptado de Hasler et ál.) (1)

Edad	N	Estructuras/ donante	Embriones/ donante	Fertilización (%)	Recuperación (%)
Novillas	28	6,1	3,8	69	57
Novillas primer parto	26	8,0	5,3	67	80
3-6 años	282	10,6	6,8	67	90
7-10 años	224	10,6	6,9	67	83
11-14 años	64	9,7	5,3	57	83
>14 años	9	5,6	2,6	50	97

Tabla 4b. Número de embriones y oocitos recuperados, oocitos sin fertilizar, embriones degenerados, embriones transferibles y número de embriones por lavado de acuerdo con la etapa de desarrollo y calidad para las donantes lactantes y no lactantes (LSD \pm S.E); (8) adaptado de Guzmán (5).

Variable	Donantes lactantes	Donantes no lactantes	P-valores
Total oocitos o embriones recuperados	5,5 \pm 2,4	13,3 \pm 2,0	<0,01
Oocitos sin fertilizar	0,9 \pm 0,6	3,9 \pm 0,5	<0,04
Embriones degenerados	0,4 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	0,34
Embriones transferibles	4,2 \pm 2,1	8,6 \pm 1,8	<0,04
	Calidad embrionaria		
Excelente/ bueno	3,6 \pm 1,8	7,1 \pm 1,5	<0,07
Pobre	0,6 \pm 0,5	1,5 \pm 0,4	<0,05

Tabla 5. Comparación de las tasas de producción de embriones de vacas fértiles o infértiles (adaptado de Hasler et ál.) (1)

	Fértiles	Infértiles
N	666	318
Fertilización	66	42%*
Embriones/ donante	6,4	2,4*
Donante sin embriones (%)	14	51*
Tasa de preñez	68	58*

DINÁMICA FOLICULAR

Antes de hablar sobre los factores ováricos es importante recordar que el ciclo estral en el bovino se caracteriza por la presencia de 2-3 ondas foliculares, cada una de las cuales se distingue por una etapa de re-

clutamiento de 20-30 folículos, crecimiento y selección de un folículo dominante y posterior atresia en caso de no haber luteolisis. Cada onda tiene una duración de alrededor de 8-10 días, la cual depende de la presencia del cuerpo lúteo (figura 1).

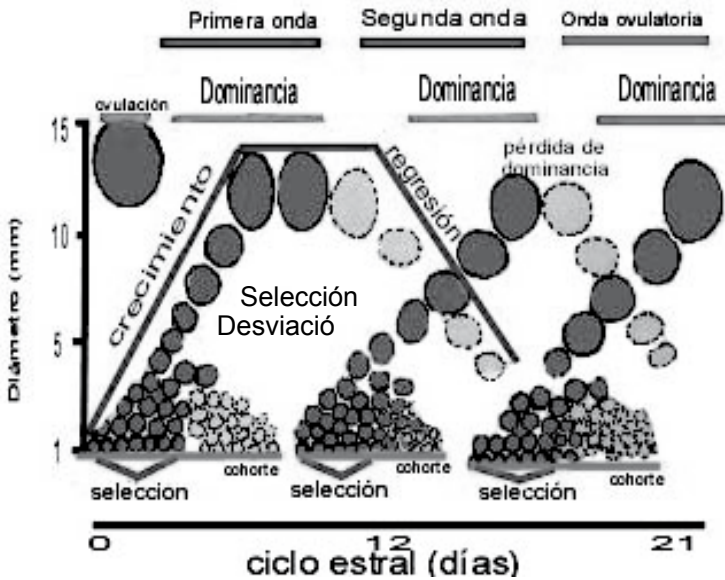


Figura 1. Dinámica folicular y ondas foliculares en el bovino (adaptado de Ireland et ál.) (9).

Los estudios han demostrado que, en la mayoría de los casos, la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio disminuye el número de embriones recuperados, por lo cual se busca evitar iniciar el tratamiento en el punto de dominancia folicular (tabla 5). Más aún, se considera ideal iniciar el tratamiento en el periodo de reclutamiento folicular.

Se han realizado varias investigaciones en búsqueda de evitar el folículo dominante, las cuales han arrojado varias opciones:

- Iniciar tratamiento superovulatorio entre el día 8-11 del ciclo estral.
- Ablación por ultrasonografía de folículos >5 mm.
- Tratamientos hormonales (la GnRH, la FSH, la LH, los estrógenos) que eliminen el folículo dominante.

Iniciar el tratamiento superovulatorio entre los días 8-11

De acuerdo con los estudios de ondas foliculares durante el ciclo estral, la mayoría de los bovinos presentan una pérdida de la dominancia folicular entre los días 8-12 del ciclo. Este punto coincide con el periodo de

reclutamiento de folículos para la segunda onda folicular, y parece ser el momento más indicado para iniciar el tratamiento superovulatorio. Al inicio del ciclo estral (días 3-4), también existe una etapa de reclutamiento, pero no se considera adecuada para iniciar tratamiento superovulatorio porque el cuerpo lúteo aún no está maduro para sufrir regresión cuando se aplique la prostaglandina 4 días después de iniciado el tratamiento con FSH.

Aspiración del folículo dominante

Este sistema permitiría eliminar el folículo dominante y así se podría iniciar el tratamiento superovulatorio sin depender del día del ciclo de la donadora (tabla 6). La recomendación cuando se realiza ablación del folículo dominante es que el tratamiento superovulatorio se inicie 48 horas después (11).

En otros estudios se ha resaltado la importancia de eliminar no solo el folículo de mayor diámetro sino los folículos que se consideren dominantes. En el estudio de Baracaldo (12) la remoción de los dos folículos más grandes mostró una mejor respuesta superovulatoria (tabla 7). Se especula que el segundo folículo puede ganar

Tabla 6. Comparación de la tasa de recuperación de embriones cuando se inicia el tratamiento superovulatorio en cualquier día del ciclo o al inicio de la onda folicular (10)

Método	No. de colectas	Embriones transferibles
4d post-CIDR	3774	6,3
Cualquier día del ciclo	4159	5,25
E2/P4 + CIDR	263	5,8

Tabla 7. Efecto de la remoción del folículo dominante sobre la producción de embriones 48h antes de la superovulación (11) revisado por Guzmán (5).

Grupo	No. vacas	No. total de estructuras	No. embriones transferibles	Embriones transferibles/ total estructuras (%)
Control	13	3,9±1,0	2,3±0,8	58,8
RFD	13	7,7±1,3*	4,6±0,9*	61,2

*P<0,05 comparado con el control.

Tabla 8. Producción de estructuras / embriones determinados a nivel de matadero (5 a 7 días después de la IA) en ganado en donde se sincronizó la onda folicular por ablación de los 2 folículos más grandes, de todos los folículos ≥ 5 mm, o por tratamiento con estradiol E-17 β + P₄ antes del tratamiento superovulatorio (adaptado de Baracaldo et ál.) (12).

Método de sincronización	No. animales	No. de estructuras / embriones		
		Total (Rango)	Fertilizados (Rango)	Transferibles (Rango)
Aspirado de 2 folículos grandes	20	11,0 \pm 1,4 (2 a 26)	9,4 \pm 1,3 (0 a 25)	8,2 \pm 1,2 (0 a 25)
Aspirado de todos los folículos	17	12,2 \pm 1,3 (4 a 20)	10,1 \pm 1,2 (2 a 19)	8,4 \pm 1,3 (0 a 18)
E-17 β + P ₄	23	8,5 \pm 1,3 (1 a 21)	7,5 \pm 1,1 (1 a 21)	6,5 \pm 0,9 (1 a 20)

dominancia una vez se realiza ablación del primer folículo y, por ende, afectar la respuesta superovulatoria.

Pareciera que el tratamiento de aspiración folicular tuviera una leve ventaja sobre el tratamiento hormonal para reiniciar la onda folicular, pero infortunadamente el equipo de aspiración es costoso aunque se ha reportado una técnica con un equipo simple (sin ultrasonido) que después de cierta práctica ofrece buenos resultados.

Hormonas exógenas

Con el estudio del efecto de hormonas como la FSH, la GnRH, los estrógenos (1-2,5 mg), la progesterona (50 mg) y la LH (o hCG), se ha logrado evitar el efecto negativo del folículo dominante y así poder iniciar el tratamiento superovulatorio en cualquier etapa del ciclo. La utilización de estas hormonas no solo elimina el folículo dominante sino que además permite sincronizar las ondas foliculares, la ovulación y, por ende, se puede inseminar en tiempo fijo. Los estrógenos, la GnRH o la LH controlan el folículo dominante ya que al ser aplicadas inducen su atresia o su ovulación ocasionando el inicio de una nueva onda folicular 4 días después. En este momento se debe iniciar el tratamiento superovulatorio.

Los tratamientos de GnRH o de estrógenos y progesterona son los más utilizados, sin que se pueda demostrar que uno es mejor que el otro. Los estrógenos más utilizados son el estrógeno natural, 17 β estradiol y el sintético, benzoato de estradiol. Los estrógenos de larga acción (valerato o cipionato) generan un efecto negativo sobre el desarrollo folicular y una pobre recuperación de embriones viables en la colecta. También se debe recordar que los estrógenos no se recomiendan en animales de consumo y, por ende, los productos tipo LH (GnRH, hCG o LH) serían más recomendados.

La hCG ha dado resultados contradictorios y, de acuerdo con éstos, es preferible no utilizarla. En un estudio se aplicaron 5.000 UI de hCG y tres días después se inició el tratamiento con FSH; al grupo control se le realizó ablación del folículo dominante (13). Los resultados mostraron una reducción en la tasa de fertilización y en el número de embriones / estructuras recuperadas y transferibles. Los autores discuten la posibilidad de que esta dosis sea demasiado alta y que posiblemente una dosis de 1.000 UI no tenga estos efectos negativos sobre los folículos reclutados (tabla 8).

Tabla 9. Respuesta ovárica y producción de embriones en vacas tratadas con hCG o aspirado folicular antes de la inducción de la superovulación (13).

Características	Control	Aspirado folicular	hCG
No. CL	10,4 ±0,9	11,0 ±0,9	8,8 ±1,7
No. óvulos y embriones	7,4 ±1,4	8,2 ±1,6	6,8 ±2,4
Tasa recuperada (%) (óvulos y embriones/ CL)	70,6 ±9,4	72,6 ±7,6	73,1 ±2,4
No. óvulos fertilizados	6,8 ±1,2	8,0 ±1,4*	3,2 ±1,8*
Tasa de fertilización (%)	92,9 ±4,4*	98,6 ±1,4*	58,1 ±17,1*
No. embriones transferibles	6,6 ±1,2*	7,8 ±1,2*	1,6 ±1,4*
Embriones transferibles/ total óvulos y embriones (%)	89,6 ±4,3*	97,1 ±2,9*	14,5 ±11,3*
Embriones transferibles / óvulos fertilizados (%)	96,7 ±3,3*	98,5 ±1,5*	19,0 ±13,6*

*P <0,05

La FSH tiene un mecanismo diferente. La administración de una primera dosis de FSH al tercer día del ciclo inhibió el desarrollo folicular por 6-7 días, permitiendo una mejor respuesta al tratamiento superovulatorio iniciado al día 10. Este protocolo ha sido debatido por varios investigadores que consideran que, por el contrario, el pretratamiento es negativo, y por consiguiente no ha sido muy utilizado.

Como conclusión tenemos que dentro de la variedad de métodos utilizados para controlar la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio, los dos tratamientos más ampliamente utilizados son los de iniciar la terapia hacia el día 10 del ciclo estral, o inyectar GnRH o estrógenos en conjunto con un progestágeno para eliminar el folículo dominante y reiniciar una nueva onda folicular.

FACTORES FARMACOLÓGICOS

En este punto se debe considerar el tipo de FSH y la presentación comercial. Dentro de los productos varía la potencia, dada en muchos casos por la relación FSH/LH. Los resultados también pueden variar según la dosis total, si se usan dosis decrecientes o constantes, los intervalos y por cuántos días se realiza el tratamiento.

HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

La hormona más utilizada para superovular el bovino es la FSH, la cual puede ser de origen ovino, porcino o bovino. Esta hormona tiene una vida media corta, y por consiguiente requiere de varias aplicaciones (3-4 días bid) para lograr su efecto.

Los productos comerciales que se encuentran disponibles en el mercado son (14):

Folltropin®	De origen porcino. 20 cc/vial = 400 mg FSH-NIH-P1 (20mg/cc)
Ovagen®	De origen Ovino. 20 cc/vial = 17,6 mg NIADDK oFSH17 (0,88 mg/cc)
Plusef®	2 viales con 500 UI FSH y 500 UI LH c/u (10 cc/vial) 50 UI FSH y de LH/cc por vial
Supero-Ov®	75 mg NIH-FSH-P1
FSH-P®	50 mg Unidades Armour por vial (salió del mercado)

GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG)

Existe otra hormona con actividad FSH conocida como la gonadotropina coriónica equina (eCG), antiguamente conocida como gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG). Esta hormona tiene, contrario a la FSH, una vida media demasiado larga (persiste en sangre por más de 10 d) y altos contenidos de LH, lo que genera una respuesta exagerada en el crecimiento folicular. Para disminuir este efecto, el animal debe ser tratado con una anti-eCG para frenar ese efecto excesivo. A pesar de la ventaja de solo requerir de una aplicación, la utilización de la eCG como hormona superovulatoria no es muy difundida. Sin embargo, la eCG puede ser una alternativa de superovulación en especial en lugares donde no es fácil realizar un protocolo con inyecciones múltiples como el requerido para la FSH.

La recomendación para la eCG es la utilización de 2000-2500 UI el día 9-11 pos-celo con aplicación de prostaglandina (PG) 48-60 h después y 5 ml anti-eCG IV con la primera inseminación.

En un experimento comparando novillas y vacas se encontró que las novillas tienen una mejor respuesta superovulatoria a la eCG que las vacas. El tratamiento consistió en tratar con eCG y anti eCG (Folligon 2500 IU IM y Neutra-PMSG 5 ml) (15) (tabla 9).

RADIO FSH:LH

Los estudios han demostrado que la FSH pura no es adecuada para la superovulación y que se requiere de la presencia de LH en los preparados comerciales para lograr una buena respuesta superovulatoria (16). Infortunadamente, una razón para la variabilidad en la respuesta superovulatoria radica en que los lotes de cada preparado comercial tienen diferentes actividades LH/FSH (variación del 78 al 127%).

Folltropin®	Bajo en LH (radio FSH/LH de 4/1).
Ovagen®	Bajo en LH.
Pluset®	Radio 1:1 de FSH/LH.
FSH-P	40mg UA : 8,5 UI (FSH/LH)

Tabla 10. Respuesta comparativa a la eCG entre novillas y vacas (15).

Grupo	Donantes (n)	Tiempo del estro (h)	CL	Óvulos recuperados	Embriones viables n (%)
eCG vacas	10	26±1	7,0±1,5	4,6±2,1	1 (2,7%)
eCG novillas	5	26±3	8,0±1,4	7,3±1,4	11 (47,8%)

En un estudio se utilizaron diferentes proporciones de FSH:LH. Todos fueron tratados con 40 mg FSH. El grupo 1 fue tratado con 0,052 IU bLH; el grupo 2 fue tratado con 0,069 IU bLH; el grupo 3 fue tratado con 0,423 IU bLH, y el grupo 4 fue el grupo control con FSH-P®, la cual contiene 40 mg AU de FSH y 8,5 IU LH (tabla 10) (17).

En otro estudio se compararon dos productos comerciales con diferente actividad de LH. Un grupo fue tratado con Folltropin (bajo contenido de LH) y el otro grupo fue tratado con FSH-P (alto contenido de LH). El número de embriones recuperados fue igual para los dos grupos, sin embargo, el grupo de Folltropin-V obtuvo un número significativa-

mente más alto de embriones viables (tabla 11) (18), adaptado de Guzmán (5).

DOSIS FSH

Las dosis de FSH se denominan Dosis Total, la cual va a ser o no dividida en varias aplicaciones (discutidas mas adelante). Es importante considerar que la dosis de FSH varía con el tipo de FSH, la especie animal (taurus/indicus) y con la raza (incluso hay variabilidad entre los individuos de una misma raza). Por consiguiente, se deben considerar los reportes y las experiencias previas para determinar cuál es la dosis más adecuada. Es preferible iniciar con dosis referenciadas por la literatura o por otros profesionales, evaluar la respuesta y,

Tabla 11. Respuesta ovárica y producción embrionaria seguida de un tratamiento con gonadotropina con diferente relación FSH/LH (17), adaptado de Guzmán (5).

Grupo (LH)	n	No. CL	No. folículos	No. óvulos + embriones	No. embriones transferibles
1. LH: 0,052	33		No superovuló		
2. LH 0,069	32	10,1±0,9 ^a	1,4±0,3 ^a	5,5±0,9	2,2±0,5
3. LH 0,423	36	12,6±1,1 ^{ab}	2,3±0,4 ^a	8,4±1,5	3,4±0,6
4. LH 8,5	34	9,0 ± 0,9 ^b	1,6±0,4	4,8±0,9 ^a	2,2±0,5

P<0,05

Tabla 12. Efecto de dos tipos de productos comerciales con diferente proporción de FSH:LH sobre la respuesta superovulatoria (18), adaptado de Guzmán (5)

Parámetro	Gonadotropina		Valor p
	Folltropin	FSH-P	
No. animales	10	11	
Respuesta superovulatoria (%)	9 (90,0%)	8(72,7%)	1,00
Total estructuras	10,0±2,2	8,5±2,4	0,64
Embriones viables	6,4±1,2	1,6±0,7	0,005 ^a
Embriones degenerados	2,8±0,9	1,1±0,4	0,10
Oocitos no fertilizados	0,8±0,3	5,8±0,9	0,05 ^a
n(%) tasa de fertilización	83(92,2%)	22(32,3%)	0,0002 ^a

si se requiere, modificarla. Inicialmente se tiene una curva donde al aumentar la dosis se aumenta la tasa de superovulación, pero esto llega a un tope posterior al cual la tasa de superovulación disminuye hasta llegar a cero. La razón para que al aumentar la dosis se afecte la ovulación no es clara, pero se cree que está relacionada con niveles elevados de P_4 durante el estro que inhiben la LH y la ovulación, y porque se presenta una regulación en baja de los receptores de FSH.

La recomendación general es (10):

- Ganado de leche 1 dosis total
- Ganado de carne 50-75% del total
- Novillas 80% de la dosis del animal adulto

Sin embargo, Schull (14) realiza una recomendación de acuerdo con un buen número de razas (tabla 12):

Tabla 13. Dosis de FSH recomendadas con respecto al 100% del vial (adaptado de Schull) (14)

Porcentaje vial	Vacas adultas	Novillas
100	Holstein Pardo Suizo	
80	Chianina Maine Anjou Shorthorn Romagnola	
64	Angus Charolais Gelbvieh Hereford Limousin Ayrshires Simental Brahman Boran Brangus Nelore	
56		Chianina Maine Anjou Shorthorn Romagnola Angus Charolais Gelbvieh
48	Red Brangus Beef Master Jersey	Hereford Limousin Ayrshire Simental
40		Brahman Boran Brangus Nelore Jersey
36		Red Brangus Beef Master

Frecuencia de aplicación de la FSH

Los estudios que han disminuido las veces que se aplica la FSH muestran que es posible utilizar frecuencias de una vez al día con los mismos resultados que si se aplican dos veces al día. Por consiguiente, en condiciones de difícil manejo, como la recolección de animales, se podría considerar la aplicación de FSH por 3-4 días pero solo realizando una aplicación diaria (tabla 13).

Bo et ál. (19) diseñaron un estudio donde se buscaba comparar dos tratamientos de superovulación (una sola inyección subcutánea frente a dos veces al día intramuscular por 4 días) (tabla 14).

En otro estudio se variaron las dosis y la frecuencia de aplicación. Se trabajó FSH-P que maneja un total de 50 mg que sería el 100%. Los animales fueron divididos en 4 grupos: Grupo I: FSH-P 6 mg una vez al día por 5 días. Grupo II: FSH-P 3 mg IM dos veces al día por 5 días. Grupo III: FSH-P 8 mg una vez al día por 5 días, y Grupo IV: FSH 4 mg IM dos veces al día por 5 días (tabla 15). En los resultados obtenidos se encontró que dosis inferiores a 6 mg en una o dos aplicaciones al día no generan una buena respuesta por parte del ovario (20).

Tabla 14. Efecto de la frecuencia de administración de la FSH sobre la tasa de fertilización y número de embriones transferibles

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Dosis FSH Folltropin®	400	360	260
SID o BID	bidx4	sidx4d	sidx4d
Embriones transferibles	10,9 (64,5%)	9,5 (46,5%)	11,1 (67,4%)
Tasa de fertilización	76,3%	65,6%	79,4%

Tabla 15. Respuesta superovulatoria a una sola inyección subcutánea frente a dos veces al día intramuscular de Folltropin-V (400mg FSH), 8 días después de la ovulación en el grupo control o 5 días después de puesto un implante auricular (adaptado de Bo et ál.) (19).

	Control		Implante	
	Inyección sencilla	Inyección dos veces al día	Inyección sencilla	Inyección dos veces al día
No. animales	18	16	19	18
CL	22,0±3,5	23,7±3,7	27,0±3,1 ^a	16,6±3,4
No. animales con <2 CL	1	1	0	2
Total estructuras / embriones	14,2±2,5	14,1±2,7	13,2±1,4	10,6±1,8
Embriones transferibles	5,4±1,5	5,5±1,7	5,4±1,0	3,9±1,5

^a P<0,09

Tabla 16. Reacción ovárica y calidad embrionaria después de la administración de diferentes dosis de FSH-P en dosis simple o dividida. Adaptada de Becker y Pinheiro (20), tomada de Guzmán (5).

	Dos veces al día		Una vez al día	
	3 mg x 2 (30 mg DT) 60%	4 mg x 2 (40 mg DT) 80%	6 mg (30 mg DT) 60%	8 mg (40 mg DT) 80%
No. animales	2	2	4	4
CL	17	27,5	20	19,5
Embriones viables	0 (0)	3,5 (27)	1,0 (14)	3,0 (55)
Embriones degenerados	3,5	9,5	6,25	2,5
Total embriones	3,5	13,0	7,25	5,5

PROTOCOLOS

Dentro de este tema se va a considerar la diferencia que hay entre protocolos tradicionales y los protocolos que hoy en día se denominan como de tiempo fijo.

Los protocolos tradicionales trabajan de acuerdo con la fisiología del ciclo estral y se busca iniciar el tratamiento al inicio de una onda folicular, el tratamiento superovulatorio se debe iniciar entre los días 8 y 11 del ciclo estral.

El siguiente es el esquema de sincronización y superovulación más antiguo, reportado para lograr iniciar el tratamiento de FSH hacia el día nueve del ciclo en ganado de carne donde se utiliza el 75% de la dosis. Si se van a utilizar varias donadoras se requiere una sincronización previa con el fin de que todas se encuentren en el mismo día (o muy cercanas) del ciclo estral.

Día	Receptoras	Donadoras
-28	PG	PG
-17	PG	PG
0	Estro	Estro
9		AM: FSH 2,4 ml
	PM:	FSH 2,4 ml
10		AM: FSH 2,0 ml
	PM:	FSH 2,0 ml
11	AM: PG	AM: FSH 1,6 ml
	PM:	FSH 1,6 ml
12		AM: FSH 1,2 ml
	AM:	PG 35 mg (7 ml)
	PM:	FSH 1,2 ml
	PM:	PG 15 mg (3 ml)
	Estro	Estro
	IA 12h después de iniciado el estro y repetir 12 horas después.	
7	Transferencia	Lavado

Los protocolos de tiempo fijo buscan sincronizar la onda folicular de varias donadoras y, por consiguiente, inician el tratamiento estimulador independientemente de la fase del ciclo estral en que estén.

Estos protocolos se basan en la utilización de una mezcla de progesterona y estrógenos, o de GnRH. Con cualquiera de estos tratamientos se logra reiniciar la onda folicular. Con la utilización de estrógenos y progesterona, la onda folicular se reinicia a los 4 días y se considera que el tratamiento con FSH se debe iniciar en este momento. Con la utilización de GnRH el inicio de la onda es más rápido, y el tratamiento de FSH se debe iniciar 36-48h después de la GnRH.

Los reportes no muestran ninguna ventaja entre E2/P₄ y GnRH, y se debe considerar que el uso de estrógenos no es recomendado para animales de consumo.

Tabla 17. Tasa de embriones recuperados por colecta y comparando dos tratamientos para reiniciar la onda folicular en bovinos (10).

Tx	Donantes	Embriones transferibles / colecta
E2/P ₄	1136	7,8
GnRH	56	7,7

ALTERNATIVAS PARA MEJORAR LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA

Se han reportado varios productos hormonales, entre ellos el uso de anticuerpos contra la inhibina, la hormona del crecimiento (bST).

INHIBINA

Takedomi et ál. (21) realizaron un estudio para tratar de establecer un protocolo de superovulación mejorado, combinando la vacunación con inhibina y con FSH exógena. Se utilizaron dos grupos, grupo control y grupo inmunizados contra la inhibina. El grupo inhibina fue tratado con un 1 mg del polipéptido por vía subcutánea en 3 a 4 lugares diferentes del animal. Después se administraron otras dos dosis (a los 35 y 70 d de la primera), correspondientes a la mitad de la primera dosis. A todos los animales se les inyectaron 30 mg de FSH porcina. Los resultados obtenidos demostraron que los animales del grupo inhibina generaron anticuerpos contra la inhibina endógena después de la primera dosis y en las dos dosis siguientes estos niveles fueron aumentando. El número de CL, de embriones recuperados

Tabla 18. Efecto de la inmunización con fragmentos de inhibina porcina en la respuesta superovulatoria con pFSH en vacas. Adaptado de Takedomi et ál. (21).

	Grupo tratado con solo p-FSH	Grupo tratado con vacuna de inhibina y pFSH
	Promedio total	Promedio total
No. vacas tratadas	36	42
No. de CL	8,2±1,0	12,1±1,2*
No. de estructuras recuperadas	5,7±1,1	11,1±1,3*
No. de embriones transferibles	3,1±0,7	6,2±1,0*

*P<0,05 comparado con valor correspondiente en el grupo control.

y transferibles fue mayor que en el grupo control (tabla 17), mostrando además que los grupos de mejor respuesta correspondían a los que tenían los títulos de anticuerpos contra la inhibina por encima del 10%.

SOMATOTROPINA

La somatotropina bovina (bST) induce la síntesis y secreción de los factores de crecimiento relacionados con la insulina (IGF), los cuales juegan un papel importante en el desarrollo folicular. Rieger et ál. (22), revisado por Guzmán (5), realizaron un estudio en Holstein donde se superovularon vacas (Folltropin®) con o sin tratamiento con bST. Al grupo bST se le administró por cada in-

yección de FSH, 20 mg de bST IM, en 2,0 ml de solución salina (dosis total 160 mg). Los resultados mostraron una tendencia mayor a la respuesta ovulatoria en el grupo bST frente al grupo control; sin embargo, ni el total de embriones ni el número de embriones transferibles se vio afectado por la bST, mientras que la proporción de embriones transferibles fue significativamente menor en el grupo bST que en el control (tabla 18).

Moreira et ál. (8) decidieron evaluar el efecto de la bST al momento de la inseminación, ya que estudios in vitro demuestran que la bST y el IGF-1 contribuyen a un mejor desarrollo embrionario y, por ende, a la calidad de éstos. Los animales fueron

Tabla 19. Efecto del co-tratamiento con bST en el número de embriones colectados el día 7 (22), revisado por Guzmán (5).

	Control	bST	P
No. embriones colectados	18	19	
No. embriones transferibles	5,2 ± 4,5	5,3 ± 4,0	0,78
No. total de embriones	7,2 ± 6,6	8,3 ± 5,3	0,37
Embriones transferibles (%)	76,5 ± 26,7	58,8 ± 31,1	0,05

Tabla 20. Número de embriones y oocitos recuperados, oocitos sin fertilizar, embriones degenerados, embriones transferibles y número de embriones por lavado de acuerdo con la etapa de desarrollo y la calidad para las donantes tratadas con bST y las control (8).

Variable	Donantes control	Donantes bST	P-valores
Total oocitos o embriones recuperados	9,4 ± 1,5	9,3 ± 1,4	0,94
Oocitos sin fertilizar	3,7 ± 0,9	1,0 ± 0,9	<0,04*
Embriones degenerados	0,3 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,23
Embriones transferibles	4,5 ± 1,4	7,4 ± 1,4	0,30
Etapa del desarrollo embrionario			
Mórula	1,7 ± 0,4	1,5 ± 0,4	0,81
Blastocisto temprano	2,9 ± 0,8	3,0 ± 0,8	0,95
Blastocisto	0,4 ± 0,6	2,4 ± 0,6	<0,04*
Blastocisto expandido	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,4	0,88
Calidad embrionaria			
Excelente/ bueno	4,8 ± 1,2	6,2 ± 1,2	0,33
Pobre	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,3	0,50

divididos en 2 grupos: grupo control y grupo bST (500 mg de bST en una sola dosis). Las vacas fueron inseminadas 12 y 24 horas después de detectado el celo y tratadas con bST con la primera inseminación. No hubo diferencias en el número total de embriones y oocitos. El número de oocitos sin fertilizar se vio reducido en el grupo bST comparado con el control, y el porcentaje de embriones clasificados como transferibles (77,2%) fue mayor en el grupo bST que en el grupo no tratado (56,4%), sin ser significativa la diferencia (tabla 19).

El tratamiento con bST al momento de la inseminación mejora la capacidad de fertilización y el número de embriones transferibles sin afectar el total de estructuras recuperadas.

SOBREESTIMULACIÓN

Este término es frecuentemente utilizado cuando una donadora da un gran número de oocitos o no se recuperan estructuras a pesar de que el ovario está significativamente aumentado de tamaño. La respuesta a este problema es disminuir la dosis, lo que

a menudo termina por reducir el número de embriones en la siguiente colecta. La recomendación es no disminuir la dosis sino cambiar de producto (10).

También se puede dar el caso de donadoras que dan un número excesivo de embriones, y la pregunta sería si esta sobreproducción afecta la calidad del embrión. Hasler et ál. (23) demostraron que la tasa de preñez de los embriones transferidos era igual entre embriones de vacas no estimuladas y embriones de vacas con respuestas superovulatorias, en las que se obtenían más de 16 estructuras (71 frente a 73%) (tabla 20).

RESULTADOS ESPERADOS

Independientemente del protocolo, los resultados esperados pueden variar mucho. En la figura 2 se muestran los resultados de 132 vacas lavadas de las cuales se obtuvieron 1227 estructuras con un promedio de 9,4 estructuras por colecta y 5,1 embriones transferibles (54,4%); (10). En la tabla 20 se puede apreciar que el ganado de leche tiende a ser más consistente en cuanto al número de embriones producidos.

Tabla 21. Efecto del número de estructuras producidas y tasa de fertilización sobre la tasa de preñez en receptoras (23).

No. de estructuras	No. transferencias	Preñez (%)
1-3	472	72
4-9	1589	74
10-15	1900	72
16-25	2061	73
>25	1046	73

Fertilización (%)	No. transferencias	Preñez (%)
10 o menos	100	74
11-40	696	71
41-70	1456	73
71-100	4841	73

Frecuencia de embriones transferibles

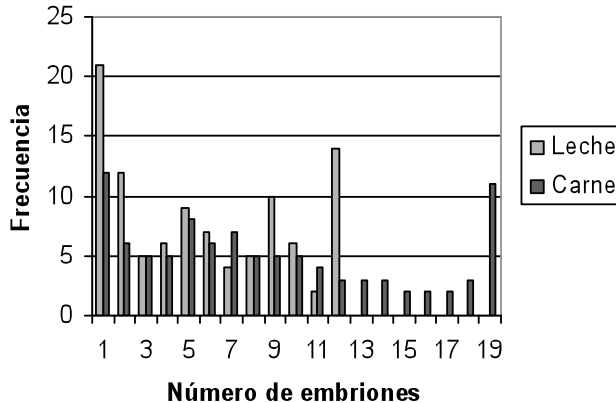


Figura 2. Producción de embriones transferibles en ganado de leche y carne. Adaptado de Hinshaw y Beal (10).

CONSIDERACIONES FINALES

Como consideraciones finales que debemos tener en cuenta para las donadoras de embriones tenemos:

- Se requiere de una dosis de FSH óptima para obtener un número óptimo de embriones transferibles que varía con cada producto de FSH, e incluso dentro del producto hay variaciones entre lotes.
- No es clara la relación precisa de FSH:LH, y ésta también varía con cada producto y cada lote, lo cual explica en muchas ocasiones la variabilidad en la respuesta superovulatoria.
- Dos inseminaciones son generalmente suficientes para lograr unas buenas tasas de fertilización.
- Se pueden establecer protocolos en tiempo fijo en programas de transferencia de embriones.
- La aplicación de FSH sid o bid puede ser igualmente efectiva en inducir superovulación, pero esto debe ser probado para cada situación.

REFERENCIAS

1. Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote RH. Superovulatory responses of holstein cows. *Theriogenology* 1983; 19: 83.
2. Chenoweth PJ. Influence of the male on embryo quality. *Theriogenology*, 2007; 68 (3): 308-315.
3. Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftinger M, Saacke RG. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J Anim Sci* 2000; 78 (8): 2081-2085.
4. Krininger III CE, Block J, Al-Katanani YM, Rivera RM, Chase CC, Hansen PJ. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim Reprod Sci* 2003; 78 (1-2): 13-24.
5. Guzmán M. Factores que afectan la superovulación en vacas. Monografía como trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia; 2002.
6. Steel R, Hasler JF. Pregnancy rates resulting from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. *Reprod Fertil Develop* 2004; 16: 182-183 (abst).

7. Leroy JL, Opsomer G, Vlieghe S de, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PE, Kruif A, Van Soom A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology* 2005; 64: 2022-36.
8. Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 2002; 57 (4): 1371-87.
9. Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J Dairy Sci* 2000; 83 (7): 1648-58.
10. Hinshaw R, Beal B. Basics of bovine embryo transfer. Proceedings of the SFT/ACT/AETA. Monterey, California; 2007.
11. Kim, HI, Son, DS, Yeon, H, Choi, SH, Park, SB, Ryu, IS, Suh, GH, Lee, CS, LEE, HJ, Yon, JT. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 2001; 55:937-945
12. Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft R.J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1239-1250.
13. Otoi T, Koyama N, Yamamoto K, Tachikawa S. Superovulatory response in beef cows following removal of the largest ovarian follicle. *Vet Rec* 1998; 142 (15): 402-3.
14. Shull JW. FSH superovulation and estrus control. Conference Proceedings of the ACT/SFT 2002; 257-260.
15. Lopes da Costa L, Chagas de Silva J and Robalo Silva J. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology* 2001; 56 (1): 65-77.
16. Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner HP, Pohland R. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42 (6): 587-99.
17. Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2001, 56:1401-15.
18. Quaresma MA, Lopes da Costa L, Robalo Silva J. Superovulation of Mortelenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLITROPIN). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 2003; 98: 81-84.
19. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft R.J. Effect of progestogen plus estradiol-17 beta treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 1996; 45 (5): 897-910.
20. Becker WAP, Pinheiro LEL. Ovarian response to superovulation in Nelore cows (*Bos taurus indicus* L.). *Theriogenology* 1986; 25,785-793.
21. Takedomi T, Kishi H, Medan MS, Aoyagi Y, Konishi M, Itoh T, Yazawa S, Watanabe G, Taya K. Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle. *J Reprod Dev* 2005; 51 (3): 341-6.
22. Rieger D., Walton JS., Goodwin ML. et al. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotropin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 1991; 35(5):863-869.
23. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large scale embryo transfer program. *Theriogenology* 1987; 27: 139-168.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENADA

1. Andrade JC, Oliveira MA, Lima PF, Guido SI, Bartolomeu CC, Tenorio Filho F, Pina VM, Iunes-Souza TC, Paula NR, Freitas JC. The use of steroid hormones in superovulation of Nelore donors at different stages of estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2003; 77 (1-2): 117-25.
2. Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft R.J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1239-1250.

3. Barros CM, Nogueira MF. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2001; 56 (9): 1483-96.
4. Benyei B, Gaspardy A, Barros CW. Changes in embryo production results and ovarian recrudescence during the acclimatization to the semiarid tropics of embryo donor Holstein-Friesian cows raised in a temperate climate. *Anim Reprod Sci* 2001; 68 (1-2): 57-68.
5. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Effect of progesterone plus estradiol-17beta treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 1996; 45 (5): 897-910.
6. Bo GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57 (1): 53-72.
7. Callesen H, Greve T, Hyttel P. Estrus characterization in superovulated cattle. *Theriogenology* 1993; 40: 1243-1250.
8. Chagas E, Silva J, Lopes da Costa L, Robalo Silva J. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Anim Reprod Sci* 2002; 69 (1-2): 1-8.
9. Chenoweth PJ. Influence of the male on embryo quality. *Theriogenology*, 2007; 68 (3): 308-315.
10. Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftzinger M, Saacke RG. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J Anim Sci* 2000; 78 (8): 2081-2085.
11. Darrow MD. Economics of bovine embryo sexing: perspective of the dairy producer and the embryo transfer practitioner. *CETA Proceedings* 2000; 39-45.
12. Diaz C, Quintela LA, Peña AI, Becerra JJ, Herradón PG. Influencia del día de inicio del tratamiento en los resultados de superovulación en vacas lecheras. *Arch Zoot* 1999; 48: 43-50.
13. Foote RH. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci* 2003; 75 (1-2): 119-39.
14. Guibault LA, Lussier JG, Grasso F, Matton P, Rouillier P. Follicular dynamics and superovulation in cattle. *Canadian Veterinary Journal* 1991; 32: 91-93.
15. Guzmán M. Factores que afectan la superovulación en vacas. Monografía como trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia; 2002.
16. Hanekamp WJA. Transfer of beef embryos in dairy cows: influence of recipient and embryo quality on pregnancy rate and calving performance. *Reprod Dom Anim* 1999; 34: 459-462.
17. Hansen S. Factors influencing the success of embryo transfer. Internet; 2001.
18. Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003; 79 (3-4): 245-64.
19. Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote RH. Superovulatory responses of holstein cows. *Theriogenology* 1983; 19: 83-
20. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large scale embryo transfer program. *Theriogenology* 1987; 27: 139-168.
21. Hinshaw R, Beal B. Basics of bovine embryo transfer. *Proceedings of the SFT/ACT/AETA*. Monterey, California; 2007.
22. Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J Dairy Sci* 2000; 83 (7): 1648-58.
23. Jousan FD, Utt MD, Whitman SS, Hinshaw RH, Beal WE. Effects of varying the holding temperature and interval from collection to freezing on post-thaw development of bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 2004; 61 (6): 1193-201.

24. Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner HP, Pohland R. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42 (6): 587-99.
25. Krininger III CE, Block J, Al-Katanani YM, Rivera RM, Chase CC, Hansen PJ. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim Reprod Sci* 2003; 78 (1-2): 13-24.
26. Leroy JL, Opsomer G, Vlieghe S de, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PE, Kruif A, Van Soom A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology* 2005; 64: 2022-36.
27. Lopes da Costa L, Chagas de Silva J and Robalo Silva J. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology* 2001; 56 (1): 65-77.
28. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42 (6): 601-11.
29. Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 2002; 57 (4): 1371-87.
30. Nogueira MF, Melo DS, Carvalho LM, Fuck EJ, Trinca LA, Barros CM. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF $_{2\alpha}$ and eCG? *Theriogenology* 2004; 61 (7-8): 1283-90.
31. Otoi T, Koyama N, Yamamoto K, Tachikawa S. Superovulatory response in beef cows following removal of the largest ovarian follicle. *Vet Rec* 1998; 142 (15): 402-3.
32. Sartori R, Suárez-Fernández CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJ, Wiltbank MC. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 2003; 60 (7): 1319-30.
33. Shull JW. FSH superovulation and estrus control. *Conference Proceedings of the ACT/SFT* 2002; 257-260.
34. Singh J, Domínguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 2004; 62 (1-2): 227-43.
35. Smith AK, Grimmer SP. Pregnancy rates for grade 2 embryos following administration of synthetic GnRH at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology* 2002; 57 (8): 2083-91.
36. Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* 2001; 56 (2): 287-97.
37. Steel R, Hasler JF. Pregnancy rates resulting from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. *Reprod Fertil Develop* 2004; 16: 182-183 (abst).
38. Stroud B, Hasler JF. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* 2006; 65: 65-76.
39. Takedomi T, Kishi H, Medan MS, Aoyagi Y, Konishi M, Itoh T, Yazawa S, Watanabe G, Taya K. Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle. *J Reprod Dev* 2005; 51 (3): 341-6.
40. Thatcher WW, Moreira F, Santos JE, Mattos RC, Lopes FL, Pancarci SM, Risco CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 2001; 55 (1): 75-89.
41. Thibier M. The animal embryo transfer industry in figures: a report from the IETS data retrieval committee. *Embryo Transfer Newsletter* 2001; 19 (4): 16-22.