

- **Materia: FISILOGIA DE LA REPRODUCCION
— ANIMAL II**
- **Tema: TECNICA DE TRANSFERENCIA DE
EMBRIONES**
- **Carrera: MVZ**
- **Cuatrimestre: 4°**
- **Alumno: Alexa yomara Téllez Méndez**

INDICE

INTRODUCCIÒN.....	3
QUE ES TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.....	4
SINCRONIZACIÒN DE HEMBRAS.....	8
RECOLECCIÒN DE EMBRIONES.....	12
EVALUACIÒN DE EMBRIONES.....	16
CONSERVACIÒN DE EMBRIONES.....	18
CONCLUSIONES.....	19
BIBLIOGRAFIA	20

Introducción

Hasta hace algunos años la colección y transferencia de embriones se realizaba en forma quirúrgica por lo que se hacía muy difícil su aplicación en terreno. El desarrollo de nuevos instrumentos, métodos de colección y colocación de los embriones en hembras receptoras, abrió la posibilidad de usarla como una técnica más en los programas reproductivos en animales de alto pedigree en los criaderos. Hoy, la técnica de transferencia de embriones, se practica en forma rutinaria en muchos países en el mundo.

La aplicación de la transferencia de embriones a nivel de criaderos se realizó transferencias con resultados de preñez similares a los obtenidos en otros países más avanzados. En su gran mayoría las donantes de embriones han sido de razas provenientes de criaderos ubicados en diferentes lugares del país.

Las razones principales de su aplicación en los criaderos nacionales han sido:

- 1) mejorar la calidad genética del criadero usando donantes importados de alta producción o hijas de animales importados nacidas en el país, 2) Obtener crías de hembras seniles de alta calidad que no son capaces de llevar a término una preñez,
- 3) El deseo del criador de tratar algo novedoso.

Este trabajo tiene como objetivo presentar una revisión general sobre la forma de realizar un programa de transferencia de embriones, en condiciones de terreno dando énfasis principalmente a una técnica no quirúrgica de colección y a las técnicas quirúrgica y no quirúrgica de colocación de los embriones en las receptoras.

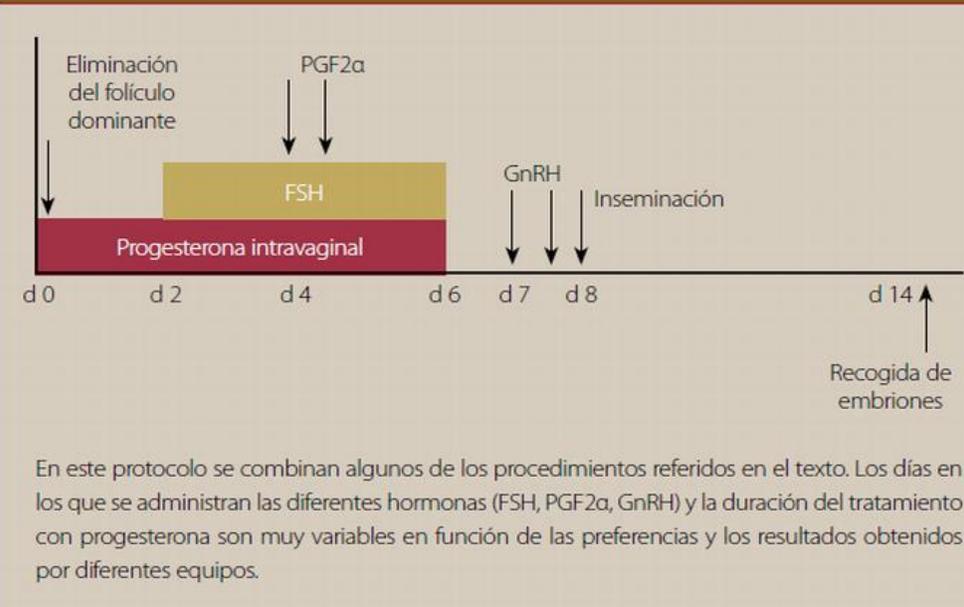
QUE ES TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La transferencia de embriones es una técnica que consiste en recoger los embriones de una hembra donante y transferirlos al útero de hembras receptoras, en las que se completara la gestación. Es una técnica completamente consolidada, ya que se utiliza con asiduidad desde hace más de 40 años con unos resultados más que aceptables.

La principal aplicación de esta técnica es incrementar la intensidad de selección en los programas de mejora genética, al permitir obtener un elevado número de descendientes por unidad de tiempo a partir de las hembras de mayor potencial genético. Además cuando se combina con semen sexado, facilita la obtención de individuos del sexo deseado para la selección, con una eficacia del 90%. Sin embargo no debemos olvidar que también puede utilizarse con fines sanitarios, por ejemplo, para evitar la transmisión vertical de neospora caninum transfiriendo los embriones obtenidos en donantes seropositivas a receptoras seronegativas.

La técnica se inicia con la estimulación hormonal de la función ovárica de la hembra donante para provocar ovulación múltiple, en lugar de la ovulación simple propia de la especie. La hembra es inseminada en el momento apropiado y posteriormente se permite a los embriones desarrollarse, en el oviducto y en el útero de la donante, hasta que se recogen mediante el lavado uterino, que suele efectuarse en el día del ciclo. Los embriones recogidos pueden transferirse a las receptoras de manera inmediata, que llevaran la gestación a términos o conservarse a bajas temperaturas durante un periodo prolongado, proceso denominado crio preservación, que permitirá utilizarlos cuando se estime oportuno.

Figura 1. Esquema de un protocolo de administración de las diferentes hormonas para provocar la superovulación e inseminar a tiempo fijo.



Se realizaron 20.497 lavados uterinos a lo largo de 2015 y se obtuvieron un total de 122.980 embriones transferibles (6,24 embriones transferibles/recogida). De ellos, fueron transferidos 112.306 (87,75%) y se utilizaron el 41,78% en fresco y el 58,21% restante después de la congelación/descongelación.

A pesar de los notables avances logrados, la principal limitación a la que se enfrenta este procedimiento es el reducido número de embriones transferibles obtenidos.

Principales avances de la técnica

A pesar de los grandes avances logrados en cuanto al conocimiento de la dinámica de crecimiento folicular y de la bioquímica de las gonadotropinas, existen todavía grandes lagunas respecto a los efectos de algunos factores intrínsecos de la hembra donante sobre la respuesta superovulatoria. Por este motivo la respuesta sigue siendo poco predecible, el número de embriones transferibles por recogida continua siendo bajo y el rendimiento comercial de la técnica.

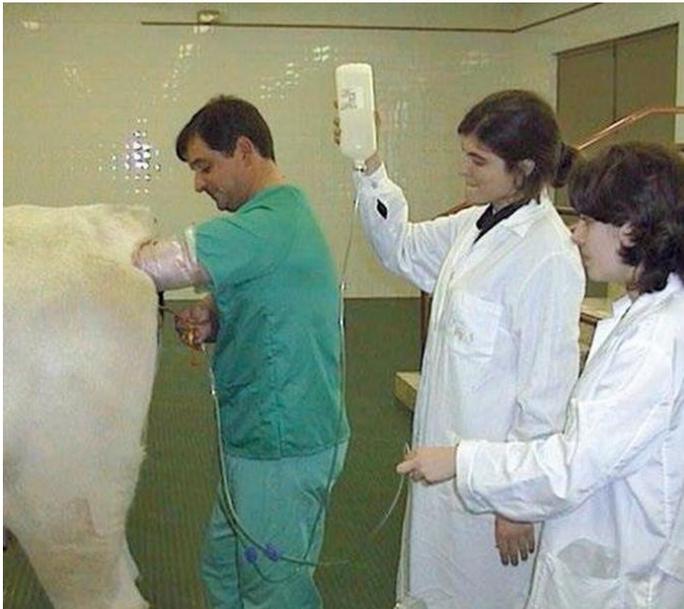
Adaptación del tratamiento a la dinámica de crecimiento folicular

Diversos estudios demostraron que las mejores respuestas se lograban cuando el tratamiento de estimulación ovárica se iniciaba a mitad del ciclo estral (entre los días

8 y 12). El uso de la ecografía permitió conocer cuál era la causa: en estos días se produce el inicio de la segunda oleada de crecimiento folicular en las hembras con dos oleadas con ciclo, aunque no sucede lo mismo en las de tres oleadas, ya que en la segunda oleada se adelanta en uno o dos días.

Factores intrínsecos de la hembra donante que afectan a la respuesta.

La respuesta al tratamiento superovulatorio estaba condicionada por el número de folículos de más de 0,7 mm de diámetro presentes en el ovario en el momento de iniciarlo. La posibilidad de predecir la respuesta de una hembra donante cuantificando el número de folículos ováricos en el momento de la emergencia de la oleada utilizando la ecografía. El número de folículos está estrechamente asociado a los niveles circulantes de la hormona anti-mülleriana (AHM). Esta glucoproteína se produce en la granulosa de los folículos antrales sanos de pequeño diámetro, por lo que su concentración sérica permitirá conocer la reserva de folículos susceptibles de responder a la gonadotropinas en el momento de iniciar el tratamiento y así predecir la respuesta.



Avance en la crio preservación de los embriones

La crio conservación permite conservar a bajas temperaturas células y tejidos vivos, paralizando sus procesos metabólicos, lo que facilita su almacenamiento durante periodos muy prolongados. Este proceso provoca algunos daños celulares que es necesario evitar, causado por la formación de cristales de hielo y por las elevadas concentraciones de solutos. Para reducirlos o evitarlos es preciso añadir crio protectores y controlar su velocidad de enfriamiento. Los embriones han sido congelados con éxito durante muchos años utilizando el glicerol penetra lentamente en las células y además debe ser eliminado de forma lenta tras la descongelación, circunstancia que obliga a utilizar varias soluciones de descongelación y un microscopio para controlar el proceso.

Sincronización de hembras

El comportamiento reproductivo es uno de los indicadores más importantes ya que un adecuado manejo incrementa el índice de preñez y por consiguiente hay un mayor número de animales disponibles para generar recursos económicos.

Para un mayor aprovechamiento del potencial productivo y genético, es necesario lograr la concepción lo más pronto posible dentro de los primeros tres meses posparto, reduciendo el intervalo entre partos e incrementando los ingresos por año. La aplicación de técnicas de manejo reproductivo que incluyan programas de sincronización de la ovulación con inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) se convierten en herramientas muy útiles. La implementación de programas de IATF permite la inseminación de un gran número de animales en un periodo establecido. Se logra obtener una cantidad considerable de crías con semen de toros de alto potencial genético, lo cual facilita y acelera el proceso de mejoramiento genético.

La sincronización de celos en bovinos permite alcanzar mejores desempeños reproductivos incrementando la efectividad de los tratamientos con la inducción de la ovulación y la ciclicidad, los cuales, asociados a otras técnicas, permiten lograr muy buenas tasas de preñez en campo. La sincronización del estro involucra el control o manipulación del ciclo estral con el propósito de que las hembras elegidas en un rebaño expresen estro (celo) aproximadamente al mismo tiempo. Es un manejo bastante utilizado en los programas de inseminación artificial (IA), trasplante de embriones, concentraciones de partos y uso intensivo, por pocos días, de un toro con monta natural. Se sabe que la exposición a progesterona es un requisito indispensable para el reinicio de la actividad ovárica posparto, y su inclusión es imprescindible para el éxito de cualquier tratamiento hormonal de anestro. El factor determinante en el éxito de la sincronización es la elección del método adecuado, que se ajuste a las condiciones de cada animal.

La inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva de suma importancia ya que se ha demostrado que es eficaz para mejorar los parámetros reproductivos, sin embargo, el problema que más afecta, es la detección oportuna del estro, sobre todo durante el periodo posparto, lo que reduce el uso potencial de la IA en

explotaciones . La detección de estros oportuna mejora substancialmente el porcentaje de concepción y, por lo tanto, la tasa de gestación. Los protocolos de sincronización por métodos hormonales han permitido realizar la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) sin la necesidad de detección del celo, facilitando y optimizando el manejo del hato.

Sincronización de celos (estros)	
OBJETIVOS DE LA SINCRONIZACIÓN DE CELOS	VENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> • Acortar el periodo de servicios y de pariciones. • Realizar IA sin detección de celos. • Inducir la actividad sexual en animales en anestro. • Realizar transferencia de embriones. • Identificación de las hembras que inician estro • Mejorar el porcentaje de concepción y la tasa de gestación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduce el tiempo de trabajo y la detección de celo. • Facilita la implementación de la IA. • Aumenta la tasa de parición y de destete. • Se obtienen lotes de terneros con pesos uniformes. • Reduce el intervalo entre partos. • Incrementa el número de terneros por año y la producción de leche y carne. • Estimula la reanudación de la actividad cíclica en las vacas en anestro post parto.

La sincronización de celos o estros es una de las técnicas más desarrolladas en la actualidad donde se emplean fármacos a base de productos hormonales obtenidos en laboratorios. Según cada producto es la forma, momento y número de aplicaciones.

Existen dos vías para sincronizar los ciclos estrales, los cuales dependen de la inhibición de secreción de LH o de acortar el tiempo de la vida del cuerpo lúteo y del inicio subsecuente del estro y la ovulación.

Prolongación de la fase lútea: este método consiste en la administración de un progestágeno (análogo de la progesterona producida naturalmente por el animal) durante un periodo relativamente largo, de forma que el cuerpo lúteo tenga una regresión natural durante el tiempo en que la hormona se administra. Con este método, el progestágeno exógeno retroalimenta negativamente la secreción de LH. Cuando se suspende el progestágeno se observa crecimiento folicular, estro y ovulación a los dos a ocho días.

Acortamiento de la fase lútea: este método induce la regresión prematura del cuerpo lúteo cíclico (luteólisis). Los dos agentes luteolíticos principales son el estrógeno y prostaglandina F₂α (PGF₂α).

Con una aplicación de PGF₂α hay regresión del cuerpo lúteo, por lo general en cuestión de 24 a 72 h, y el estro y la ovulación se presentan dentro de los dos o tres días. Aunque el cuerpo lúteo es sensible a los agentes luteolíticos, estos agentes no causan regresión del cuerpo lúteo en los primeros cuatro a seis días del ciclo.

Para sincronizar exitosamente se tiene que lograr una caída rápida de los niveles de progesterona por debajo de 1 ng/ml obteniendo un crecimiento uniforme y la ovulación de un folículo viable.

Esto implica, sin embargo, que la PGF₂α es efectiva solamente cuando existe la presencia de un cuerpo lúteo completamente desarrollado, lo que ocurre durante los días 7-18 del ciclo y que el retiro de la progesterona exógena es solamente efectivo si la regresión del cuerpo lúteo ha ocurrido, ya sea de manera inducida o natural. Se pueden presentar variaciones en la dinámica de las ondas foliculares que dificultan controlar de manera precisa el momento del celo y de la ovulación.

En general, podemos clasificar a los protocolos de IATF (IA con sincronización de celos) en aquellos que utilizan combinaciones de GnRH y prostaglandina F₂α,

llamados protocolos Ovsynch y los que utilizan dispositivos con progesterona (P4) y estradiol.

Es recomendable que estos métodos de sincronización se apliquen a vacas entre el segundo y quinto parto, con condición corporal mayor o igual a 2.5 y menor a 4 (en escala de 1 a 5) y sin enfermedades clínicas y sin registros previos de distocias o trastornos durante el puerperio.



La sincronización de celos en bovinos permite alcanzar mejores desempeños reproductivos.

RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Los embriones bovinos, destinados a un programa de TE pueden ser obtenidos del útero por medios no quirúrgicos. Su recolección y transferencia con éxito dependen de varios factores. En primer lugar de la resistencia de éstos para sobrevivir y llegar a término después de ser recolectados del tracto genital, evaluados *in vitro* y transferidos a un genital receptor, con cambios de medio y temperatura.

En segundo lugar depende de que la técnica de obtención no ponga en peligro la integridad del tracto genital, a fin de poder repetirla tantas veces como sea deseable y conveniente. La primera técnica de recolección de embriones bovinos usada hace aproximadamente dos décadas, fue quirúrgica. La misma requería anestesia general, inducida por medio de barbitúricos y mantenida por medio de inhalación (halotano). Por medio de una incisión de 15 cm de longitud en la línea media, por delante de la glándula mamaria, se extraían los cuernos uterinos con los ovarios. El lavaje de los cuernos y oviductos se llevaba a cabo el día 5-7 introduciendo catéteres de goma a través de la pared dorsal del cuerno uterino y en la ampolla del oviducto.

La manipulación quirúrgica del útero y de los ovarios conduce a lesiones que provocan formación de fibrina y adherencias. Para minimizar ese efecto fue necesario trabajar con buenas condiciones de asepsia, lavando el útero y los órganos adyacentes con solución fisiológica estéril, conteniendo heparina. Con estas precauciones era posible llevar a cabo el lavaje a una vaca sólo tres veces como máximo, lo que constituye una seria limitante en el uso repetido de esta técnica.

La tasa de éxito varió entre 50 y 70% de embriones y ovocitos obtenidos, en función del número de cuerpos lúteos presentes. Otra variante de la recolección quirúrgica fue el by-pass propuesto por TESTART y GODARD-SIOUR, colocando la sonda a través de la pared uterina por medio de vaginotomía bajo anestesia epidural.

Después de la colocación, el catéter de goma era fijado por medio de un balón inflable. El útero era lavado con 50-70 ml de medio. Esta técnica permitió obtener 40-50% de embriones. Las infecciones y adherencias en los cuernos uterinos y

oviductos constituyeron las desventajas que limitaron, como en el caso anterior, la receptibilidad de la recolección e impidieron su difusión en la práctica.

Métodos no quirúrgicos de recolección

La posibilidad de colocar en la especie bovina la sonda a través de la cervix abrió nuevas posibilidades a la recolección de embriones, simplificando el procedimiento y disminuyendo el trauma uterino. Para ello se crearon diferentes modelos de catéteres: rígidos, semirrígidos y flexibles.

Los mismos podían tener 2 vías, una para insuflar el balón de goma e inmovilizar el catéter y la segunda para inyectar y recolectar el medio. RASBECH un sistema semirrígido de recolección, a partir de una sonda

Foley de 2 vías. El volumen de aire a insuflar oscilaba entre 12-15 ml. La inyección de medio se llevaba a cabo con una jeringa de 60 ml. La sonda Foley era introducida en un tubo rígido, quedando libre el extremo anterior, a partir del balón para el aire y el extremo posterior.

Los catéteres de 3 vías permiten inyectar el medio por la segunda vía mientras la tercera conduce el líquido fuera del útero. En la actualidad se emplean catéteres rígidos y flexibles, de 2 y 3 vías, y 3 métodos de recolección (*Circuito cerrado con flujo continuo, Circuito cerrado con flujo discontinuo, Circuito abierto con flujo discontinuo*).

Circuito cerrado con flujo continuo: se emplean catéteres de 3 vías, rígidos o flexibles, Una vía, destinada a la inyección del medio de lavaje, se conecta al frasco que contiene la solución por medio de una tabuladora de goma látex o silicona. La solución puede inyectarse por gravedad, colocando el frasco con el medio a aproximadamente 1 m por encima del frasco recolector o con una jeringa, con el mismo procedimiento que el método de flujo discontinuo. Por la segunda vía se inyecta aire o medio para llenar el balón y por medio de una tercera vía se recolecta la solución de lavaje, sin interrumpir la descarga.

Circuito cerrado con flujo discontinuo

Con este método se usa el catéter de 2 vías, una jeringa de 50-60 ml, una válvula automática o manual, una unión de vidrio o plástico en forma de **T** o **Y** y las tabuladoras. La válvula, que se coloca a la salida del frasco, permite extraer el medio e inyectarlo en el interior del cuerno uterino. Luego de la inyección de un volumen variable de medio (30-50 ml) se interrumpe el flujo de llenado para proceder a la segunda maniobra; el cuerno es vaciado por la misma vía. Al ocluir la tabuladora de inyección la unión de vidrio en **Y** desvía el medio a la segunda tabuladora que lo conduce al frasco recolector.

Circuito abierto con flujo discontinuo

Inyección y recolección con una jeringa.

Esta técnica se emplea con los catéteres flexibles de 2 vías y no requiere de tabuladoras. El medio se inyecta y recolecta por la misma vía y con la misma jeringa (50 ml).

Con ésta se descarga un volumen de medio fijado por el operador quien, como en el caso anterior, debe palpar el cuerno uterino *determinando y controlando su llenado* a fin de evitar lesiones de la pared uterina por exceso de medio. Las maniobras siguientes variarán de acuerdo al tipo de técnica de lavaje que se aplique. Algunos operadores fijan y masajean el útero durante la inyección del medio.

Esta operación es particularmente importante cuando el animal no está fijado con una elevación del tren anterior, que facilite el retorno del líquido de lavaje. Las dimensiones y peso del útero requieren que éste sea elevado por el operador. Cuando la donante es fijada con una elevación anterior algunos operadores no manipulan los cuernos uterinos, sólo verifican una vez el llenado. Luego retiran el brazo del recto y continúan con la inyección de medio hasta completar el volumen preestablecido de líquido.

La recolección de los embriones en esta posición facilita el lavaje en animales con pariciones múltiples, aun cuando se emplee además el masaje de útero. Esta forma es aplicada en los Centros de TE donde ya se cuenta con la infraestructura necesaria. Presenta la ventaja que la manipulación no irrita al animal y facilita la

operación. Mientras se descarga la jeringa en el frasco recolector el catéter es ocluido con una pinza hemostática o un clamp.

Ventajas y desventajas de tres métodos de recolección

Todas las técnicas, con sus diferentes modificaciones, como así también los catéteres mencionados se emplean en la práctica con el mismo éxito. Por lo tanto, las diferencias entre ellos, como así también las ventajas y desventajas observadas, no constituyen elementos de juicio excluyentes de uno u otro. El operador será el que determine, en función de su experiencia, medios e infraestructura disponible, qué técnica es la más adecuada para su *modus operandi*. Independientemente de esos factores, su destreza es el factor *más importante en la tarea de obtener los embriones*.

El sistema de circuito cerrado con flujo continuo permite, en su concepción teórica, un lavaje más aséptico frente al método de inyección y extracción con jeringa, ya que el medio es conducido desde el útero hasta el filtro o el frasco de recolección sin solución de continuidad. Ello es particularmente importante cuando los lavajes se llevan a cabo en lugares abiertos. Sin embargo la tubuladura no es fácil de lavar y secar, lo que puede provocar en la práctica, **contaminaciones bacterianas**, como consecuencia de un lavado insuficiente o **químicas**, provocadas por un mal enjuagado o por la deposición de sustancias esterilizantes (dióxido de etileno) en los restos de humedad.

EVALUACIÓN DE EMBRIONES

La calidad embrionaria es un determinante importante para el éxito de los procedimientos de transferencia de embriones. Varios métodos se han reportado, pruebas de exclusión por coloración, las medidas de la actividad enzimática, captación de glucosa, y tinturas para diferenciar vivos y muertos, son útiles para predecir la supervivencia de los embriones después de la transferencia, pero los métodos requieren un equipo complejo y largo proceso en el período de cultivo in vitro, por lo tanto son de poco valor para la transferencia de embriones en condiciones de campo. Hasta la fecha, la evaluación morfológica ha sido ampliamente utilizada para evaluar la calidad del embrión y es útil para predecir las tasas de preñez para grupos de embriones bovinos después de la transferencia.

La evaluación de embriones sigue siendo uno de los métodos más subjetivos y cualitativos en la transferencia de embriones y la categorización de las normas varía entre los investigadores.

Algunos investigadores han descrito una evaluación efectiva de los embriones bovinos recuperados de vacas súper ovuladas. Se identificaron cuatro categorías basadas en características morfológicas, es decir, excelentes, buenas, regulares, y pobres.

Embriones con excelentes calidades y buenas calidades dan las mayores tasas de preñez, mientras que los embriones de pobre calidad arrojan resultados con menores tasas de éxito, lo que indica que la calidad del embrión puede ser un factor de predicción preciso de la tasa de preñez. Este método de evaluación consiste en la identificación de calidades del embrión en base a parámetros morfológicos tales como, la forma, el color, el tamaño del espacio perivitelino, el número de extrusión y células degeneradas, y el número y tamaño de las vesículas.

Varios factores, tales como la calidad de los ocitos, la tensión de oxígeno, la densidad de embriones, y el tipo de sustrato de energía durante la producción in vitro de embriones pueden afectar la tasa de preimplantación y el desarrollo del embrión.

Criterios de evaluación morfológica de embriones

ESTRUCTURA Y CUALIDADES
Forma esferoide
Simetría de los blastómeros
Apariencia clara y neta de los blastómeros
Tonalidad oscura y uniforme
Unidad de la membrana celular
Proporcionalidad entre el embrión y el espacio peri vitelino
Integridad de la zona pelucida
Ausencia de vacuolas en el embrión y bridas celulares en el espacio perivitelino
Ausencia de detritus celulares adheridos a la zona pelucida
Compactación de los blastómeros

CONSERVACIÓN DE EMBRIONES

Un paso indispensable en la transferencia de embriones es la conservación temporal de los embriones recolectados de una donante antes de ser transferidos o congelados, ésta se realiza en un medio de Solución Buffer Fosfato (PBS), suplementado con 10% de suero fetal bovino que representa una fuente de proteínas que reduce la tensión superficial, favorece la sedimentación, evita que los embriones se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación, incorpora sustancias promotoras del crecimiento que favorecen su desarrollo, absorbe e inhibe metales pesados tóxicos que puedan estar presentes en el medio. La viabilidad embrionaria declina después de 12 horas.

Los embriones de bovinos mantenidos en un medio no nutritivo por un largo tiempo y a temperatura ambiente decrecen ampliamente su capacidad de desarrollo, este desarrollo puede ser preservado si los embriones se refrigeran de 0 a 4 °C por no más de 24 horas técnica denominada refrigeración la cual se efectúa vehiculizando los embriones en

PBS envasados en pajuelas de 0.25 ml y colocadas en un refrigerador. Se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura. La refrigeración de embriones puede ser considerada como una alternativa interesante cuando no sea posible recurrir a la criopreservación.

Conclusión

En esta investigación hay muchos factores que pueden influir en el éxito del trabajo, como por ejemplo el protocolo, la calidad de las donantes, las receptoras; y la calidad del semen, pues se debe utilizar semen de altísima fertilidad. Tal vez los resultados finales de una transferencia de embrión se vean una vez que nazcan los terneros, y luego cuando les llegue la edad de expresar su potencial productivo, como por ejemplo al quedar preñadas, empezar a parir y obtener buenos ejemplares.

Bibliografía

- 1.- Hasler JF. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81,152-169.
- 2.- Baillargeon P, Fecteau G, Pare J, Lamothe P, Sauvé R. (2001). Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *JAVMA*, 218: 1803-1806.
- 3.- IETS Data Retrieval Committee (2016). 2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals
- 4.- Hasler JF. (1992). Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 75: 2857-2879.
- 5.- Carballo Guerrero D, Tríbulo A, Tríbulo R, Tríbulo H, Bó GA. (2010). Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four d after progesterone and estradiol administration. *Reprod Fertil Dev.* 22: 358.
- 6.- Mapletoft R, Bó G. (2012). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev* 24: 278–283.
- 7.- García Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Adams GP, Singh J, Mapletoft RJ. (2015). Lengthened superstimulatory treatment in cattle: Evidence for rescue of follicles within a wave rather than continuous recruitment of new follicles. *Theriogenology* 84: 467-476
- 8.- Hasler J, Hockley D. (2012) Efficacy of hyaluronan as a diluent for a two injection FSH superovulation protocol in *Bos taurus* beef cows. *Reprod Dom Anim* 47: 459.
- 9.- Monniaux D, Chupin D, Saumande J. (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19: 55–82.
- 10.- Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé JL, et al. (2012) Determination of anti-Mullerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod*

Fertil Dev 24: 932–944.

11.- Arav, A. (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. Theriogenology. 81: 96–102