



Dos protocolos de superovulación en donantes de embriones en vacas mestizas en el trópico

Two superovulation protocols in embryo donors in crossbred cows in the tropics

Autores: Freddy Zambrano¹
Ernesto Antonio Hurtado²
Fátima Arteaga³
Derlys Mendieta⁴

Dirección para correspondencia: ernestohurta@gmail.com

Recibido: 17-10-2019

Aceptado: 25-01-2020

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad de dos protocolos de superovulación en vacas mestizas de la hacienda La Balda del cantón El Carmen. Se seleccionaron 10 vacas genéticamente superiores, en condiciones nutricionales y sanitarias óptimas, que fueron aleatorizadas en dos grupos de estudio (n=5). El primer grupo recibió 200mg de FSH en 8 dosis (Folltropin-V); mientras que el segundo grupo fue tratado con 140mg de FSH en 4 dosis + 400 U.I de eCG dosis única (Folltropin-V + Folligon). Las variables a medir fueron: número de cuerpos lúteos; número de embriones aptos para ser lavables; número de embriones aptos para ser transferidos y grados de calidad embrionaria. La comparación de los grupos se analizó estadísticamente a través de la prueba T-Student para muestras pareadas o relacionadas. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ninguna de las variables en estudio ($P>0,05$). Sin embargo, el análisis costo/ beneficio mostró

¹ Carrera de Medicina Veterinaria. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Ecuador.

² Carrera de Medicina Veterinaria. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Ecuador.

³ Carrera de Medicina Veterinaria. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Ecuador.

⁴ Carrera de Medicina Veterinaria. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Ecuador.

que los animales del primer grupo resultaron con un tratamiento más rentable, siendo superior en 33% con respecto al segundo grupo. Los protocolos hormonales utilizados son alternativas de manejo reproductivo, con repercusión económica.

Palabras clave: Reproducción; cuerpos lúteos; hormonas; bovinos; rentabilidad.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the effectiveness of two protocols of superovulation in mestizo cows from the La Balda ranch of El Carmen canton. Ten genetically superior cows were selected, under optimal nutritional and health conditions, which were randomized into two study groups (n = 5). The first group received 200mg of FSH in 8 doses (Folltropin-V); while the second group was treated with 140mg of FSH in 4 doses + 400 U.I of eCG single dose (Folltropin-V + Folligon). The variables to be measured were: number of corpora lutea; number of embryos capable of being washable; number of embryos able to be transferred and embryo quality grades. The comparison of the groups was analyzed statistically through the T-Student test for paired or related samples. No statistically significant difference was found between any of the variables under study ($P > 0.05$). However, the cost / benefit analysis showed that the animals of the first group resulted with a more profitable treatment, being 33% higher than the second group. The hormonal protocols used are alternatives for reproductive management, with economic repercussion.

Keywords: Reproduction; corpora lutea; hormones; bovines; profitability.

Introducción

Según Pérez *et al.* (2007) América Latina comparte una baja eficiencia reproductiva manifestada por la baja producción de terneros destetados, avanzada edad al primer parto y el prolongado anestro post parto de los rebaños. Balarezo *et al.* (2016) atribuyen el problema a prácticas inadecuadas de manejo reproductivo, factores ambientales, genotipo, enfermedades reproductivas y factores nutricionales.

La provincia de Manabí, en Ecuador, caracterizada por poseer ganado doble propósito, alcanza un rendimiento promedio de 3,63 L/vaca/día (INEC, 2015). En la provincia del Carchi, los rebaños lecheros especializados tienen niveles productivos de 15-18 L/vaca/día. Sin embargo, un estudio de 150 vacas Holstein reveló intervalos entre partos de 554 a 622 días y la natalidad entre 58 y 65%. Además, intervalo parto- concepción superior a 270 días que representan pérdidas económicas mayores a 50.000 USD para esta muestra (Balarezo *et al.*, 2016).

Estos datos reflejan la necesidad de obtener animales de mejor genética para aumentar la eficiencia reproductiva y la rentabilidad de los sistemas de crianza en el país. El uso de biotecnologías reproductivas es el eje fundamental para el

mejoramiento genético del ganado, dentro de estas, la superovulación y la transferencia de embriones permiten optimizar la recolección de embriones de cada hembra donante, y así multiplicar la población bovina de élite (Uffo, 2011).

La transferencia de embriones es utilizada en dos formas tanto en embriones frescos como embriones congelados. Esto consiste en la superovulación de vacas que cuenten con los parámetros genéticos óptimos que el productor desea. La superovulación consiste en que la vaca seleccionada sea estimulada a base de hormonas para la producción de una mayor cantidad de óvulos para posteriormente ser inseminada y 6 a 8 días después será realizada la colecta de embriones bajo los protocolos correspondientes (Colomo, 2015).

La utilización de hormonas ha sido lo requerido para el proceso de superovulación; siendo tres tipos de gonadotrofinas exógenas para inducir el proceso en donantes bovinas: extractos de pituitaria de animales domésticos, gonadotrofina coriónica equina (eC o PMSG) y gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Becaluba, 2007).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad de dos protocolos de superovulación aplicados a vacas mestizas de la hacienda La Balda del cantón El Carmen.

Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en la Hacienda La Balda ubicada en el sitio Limones de la parroquia rural San Pedro de Suma, perteneciente al cantón El Carmen situado al noreste en la provincia de Manabí, entre las coordenadas geográficas Latitud: 0° 16'11" Sur y Longitud: 79° 25'26" Oeste.

La parte experimental se estructuró principalmente con la selección, preparación y manejo de las vacas donantes. Posteriormente se realizó el proceso de superovulación y colecta de embriones.

Manejo de las Unidades Experimentales

Se utilizaron 10 vacas mestizas, con características genéticas superiores (registro de producción lechera y composición corporal superior a tres), peso entre 350 a 400 Kg aproximadamente y un número máximo de tres partos. Se realizó verificación de ciclos estrales regulares mediante palpación rectal, además se descartó la presencia de enfermedades reproductivas a través de un examen sanguíneo del paquete reproductivo.

Las vacas donantes fueron divididas aleatoriamente en dos grupos de estudio, que permitió su agrupación en los siguientes tratamientos de superovulación: 200mg FSH (T1) y 140mg FSH + 400 U.I eCG (T2). Además se mantuvieron con manejo similar en lo que respecta a alimentación, alojamiento (semiestabulación) y sanidad.

Aplicación de protocolos de superovulación

Se realizó el proceso de superovulación de los distintos tratamientos, de acuerdo a los protocolos que a continuación se presentan (Tabla 1 y 2):

Tabla 1. Cronograma de aplicación del protocolo para el tratamiento 1(n=5)

| Día de aplicación | Hora | Protocolo y dosis administrada | Nombre comercial |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 0 | 08:00 a.m. | 2mg Benzoato de estradiol + 50mg Progesterona + dispositivo intravaginal | CIDR |
| 4 | 08:00 a.m. 20:00 p.m. | 40mg FSH 40mg FSH | Folltropin-V Frasco 400mg FSH/ 20ml |
| 5 | 08:00 a.m. 20:00 p.m. | 30mg FSH 30mg FSH | Folltropin-V Frasco 400mg FSH/ 20ml |
| 6 | 08:00 a.m. 20:00 p.m. | 20mg FSH + PGF2a 2ml 20mg FSH + PGF2a 2 ml | Folltropin-V Frasco 400mg FSH/ 20ml Lutalyse Frasco 5mg/ 30ml |
| 7 | 08:00 a.m. 20:00 p.m. | 10mg FSH 10mg FSH + Retiro del dispositivo | Folltropin-V Frasco 400mg FSH/ 20ml |
| 8 | 08:00 a.m. 20:00 p.m. | GNRH 100mcg Inseminación artificial | Ovarelin Frasco 20ml 50mcg/ ml |
| 9 | 08:00 a.m. 20:00 p.m. | Inseminación artificial | |
| 15 | | Colecta de embriones | |

Tabla 2. Cronograma de aplicación del protocolo para el tratamiento 2 (n=5)

| Día de aplicación | Hora | Protocolo y dosis administrada | Nombre comercial |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 08:00 a.m. | 2mg Benzoato de estradiol + 50mg Progesterona + dispositivo intravaginal | CIDR |
| 4 | 08:00 a.m. 20:00 p.m. | 40mg FSH 40mg FSH | Folltropin-V Frasco 400mg FSH/ 20ml |
| 5 | 08:00 a.m. 20:00 p.m. | 30mg FSH 30mg FSH | Folltropin-V Frasco 400mg FSH/ 20ml |

| | | | | |
|-----------|--------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|------------------|
| 6 | 08:00 a.m. | 400 UI ECG + PGF2a 2ml | Folligon 5000UI Lutalyse 5mg/ 30ml | Frasco Frasco |
| 7 | 08:00 a.m. | Retiro del dispositivo | | |
| 8 | 08:00 a.m. 20:00 p.m. | GNRH 100mcg Inseminación artificial | Ovarelin Frasco 20ml 50mcg/ ml | |
| 9 | 08:00 a.m. | Inseminación artificial | | |
| 15 | 08:00 a.m. | Colecta de embriones | | |

Lavado uterino, recolección y evaluación de embriones

El lavado uterino de las donantes se realizó a los siete días después de la inseminación artificial. Todos los materiales utilizados fueron estériles, primero se colocó a la vaca donante en una manga, se rasuró y lavó la base de la cola y la vulva, se aplicó 2 ml de anestesia epidural (lidocaína al 2%) para inmovilizar la cola del animal y evitar las contracciones rectales. Luego se realizó palpación rectal con guantes ginecológicos para determinar el número de cuerpos lúteos y se verificó mediante ecografía transrectal (Ecógrafo portátil Aquila Vet.).

Posteriormente se introdujo la mano por el recto para la manipulación del cérvix y de los cuernos uterinos, luego se procedió a introducir un mandril cubierto por una sonda Foley calibre 18 para llegar al cuerno uterino donde se infló el balón.

Una vez introducida la sonda Foley se extrajo el mandril y se conectó con un circuito Y para introducir y extraer el medio de lavado y arrastre PBS (aproximadamente 500 ml por cuerno uterino).

Después de recuperado el medio de lavado los embriones fueron aislados del volumen total mediante métodos de filtración (Filtro Em-Com) y drenaje, para poder realizar su evaluación morfológica y determinar su utilización posterior en un microscopio de contraste de fase. Se utilizó medio Holding de mantenimiento. Fueron clasificados de acuerdo a su estadio de desarrollo, 1 (estadio de una célula) al 9 (estadio de blastocisto eclosionado), y según su calidad (1- 4): excelente o bueno, regular, pobre, muerto o degenerado.

Variables estudiadas

Tasa de ovulación (número de cuerpos lúteos)

Antes de la colecta de embriones, se realizó palpación rectal con guantes ginecológicos a las 10 vacas superovuladas para determinar el número de cuerpos lúteos formados en los dos ovarios de cada animal de los distintos grupos de estudio.

Embriones aptos para ser lavados

Se realizó evaluación de la integridad morfológica de los embriones mediante observación en el microscopio y sólo se obtuvieron aquellos que contaban con una zona pelúcida intacta.

Calidad embrionaria

Se determinó mediante la observación al microscopio de características como: compactación de células, regularidad en la forma del embrión, variación en el tamaño de las células, color y textura de citoplasma, presencia de vesículas, células extruídas y diámetro y regularidad de la zona pelúcida. Se utilizó la clasificación propuesta por Bó *et al.* (2013):

Grado 1: Excelente o bueno (> 85% de integridad morfológica)

Grado 2: Regular (> 50% de integridad morfológica)

Grado 3: Pobre (> 25% de integridad morfológica)

Grado 4: Muerto o degenerado

Embriones aptos para ser transferidos

Durante el estudio se consideraron embriones aptos para ser transferidos a aquellos que contaban con calidad grado 1 y grado 2.

Análisis estadístico

El análisis de las observaciones se realizó con la prueba T- Student al 5% para muestras pareadas o relacionadas en el programa estadístico SAS (2016, versión 9.4).

La Relación costo/ beneficio fue realizada en los dos grupos de estudio para conocer la factibilidad económica.

Resultados

Tasa de ovulación (número de cuerpos lúteos)

En la Tabla 3 se observa que no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0,05$) entre los tratamientos para la variable número de cuerpo lúteo (derecho, izquierdo y total). Sin embargo, en el lado izquierdo se cuantificaron mayor cantidad de cuerpos lúteos en el tratamiento 2 ($7,80 \pm 1,1$); esta diferencia numérica hace ha dicho tratamiento con mejor promedio en el total de cuerpos lúteos ($14,60 \pm 2,46$).

Tabla 3. Promedios y error estándar de Cuerpos Lúteos (n) en los distintos grupos bajo estudio

| Tratamientos | Variable | | |
|--------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| | Cuerpo lúteo derecho | Cuerpo lúteo izquierdo | Total de cuerpos lúteos |
| | NS | NS | NS |
| T1 | $6,60 \pm 1,07$ | $6,80 \pm 1,49$ | $13,40 \pm 2,48$ |

| | | | |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|
| T2 | 6,80 ± 1,39 | 7,80 ± 1,11 | 14,60 ± 2,46 |
| p=valor | 0,9281 | 0,5385 | 0,6931 |
| T (0,05) | 0,10 | 0,67 | 0,42 |

Promedios de las variables no difieren estadísticamente según la prueba T Student al 5% de probabilidad

NS: No significativo

Calidad embrionaria (Grados)

Se evidencia que no existe diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0,05$) para la calidad embrionaria (Grados) (Tabla 4). No obstante, se observa en el tratamiento 1 un mayor promedio de embriones grado 1 ($3,60 \pm 1,16$) con respecto al tratamiento 2 ($2,20 \pm 0,66$).

Tabla 4. Promedios y error estándar de Calidad Embrionaria (grado 1) en los distintos grupos bajo estudio.

| Tratamientos | Variable |
|---------------------|--------------------------|
| | Embriones Grado 1 |
| | NS |
| T1 | 3,60 ± 1,16 |
| T2 | 2,20 ± 0,66 |
| p=valor | 0,1716 |
| T (0,05) | -1,66 |

Promedio de la variable no difiere estadísticamente según la prueba T Student al 5% de probabilidad

NS: No significativo

Embriones aptos para ser lavados-transferidos (número)

La Tabla 5 el efecto no significativo de los tratamientos ($P > 0,05$) para la variable embriones aptos para ser lavados-transferidos en los grados 1 y 2. Se observa una superioridad en el promedio de embriones de grado 1 y 2, para aquellas vacas que se le aplicó el tratamiento 1 (200mg FSH).

Tabla 5. Promedios y error estándar de Embriones Aptos para ser lavados- transferidos grado 1 y 2 (n) en los distintos grupos bajo estudio.

| Tratamientos | Variable | |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Embriones grado 1 | Embriones grado 2 |
| | NS | NS |
| T1 | 3,60 ± 1,16 | 1,80 ± 0,58 |
| T2 | 2,20 ± 0,66 | 1,00 ± 0,54 |
| p=valor | 0,1716 | 0,0856 |
| T (0,05) | -1,66 | -2,27 |

Promedios de las variables no difiere estadísticamente según la prueba T Student al 5% de probabilidad

NS: No significativo

Etapas de desarrollo embrionario (estadios).

Las etapas de desarrollo embrionario (mórula, mórula compacta y blastocisto temprano) por tratamientos se presenta en la Tabla 6, se observa un efecto no significativo de los tratamientos bajo estudio ($P > 0,05$) en cada uno de los estadios. Sin embargo, los promedios obtenidos en las distintas etapas de desarrollo embrionario fueron superior en las vacas tratadas con el tratamiento 1. Se destaca que en el tratamiento 2 no se observó número de blastocistos, mientras que el tratamiento 1 presento un promedio de $0,40 \pm 0,4$.

Tabla 6. Promedios y error estándar de Estadios de Desarrollo (mórula, mórula compacta y blastocisto temprano) en los distintos grupos bajo estudio.

| Tratamientos | Variable | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| | Mórula | Mórula compacta | Blastocisto temprano |
| | NS | NS | NS |
| T1 | $4,20 \pm 1,20$ | $1,60 \pm 0,74$ | $0,40 \pm 0,4$ |
| T2 | $2,80 \pm 0,73$ | $0,40 \pm 0,40$ | $0,00 \pm 0,00$ |
| p=valor | 0,2660 | 0,1932 | 0,3235 |
| T (0,05) | -1,29 | -1,56 | -1,13 |

Promedios de las variables no difieren estadísticamente según la prueba T Student al 5% de probabilidad

NS: No significativo

Relación costo/ beneficio

En la Tabla 7 se presentan los cálculos realizados para estimar la relación costo/beneficio. Se observa una relación favorable para el tratamiento 1 que supera en más del 30% al tratamiento 2.

Tabla 7. Análisis económico de los tratamientos bajo estudio

| Descripción | Tratamiento 1 (\$) | Tratamiento 2 (\$) |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Total Egresos | 1243,5 | 1143,5 |
| Total Ingresos ¹ | 14400 | 8800 |
| Diferencia | 13156,5 | 7656,5 |
| Relación Costo/beneficio | 1: 11,58 | 1: 7,69 |

¹ Embriones viables a \$800 valor de referencia de mercado

Discusión

Tasa de ovulación (número de cuerpos lúteos)

El número de cuerpos lúteos totales es superior al obtenido por Salinas (2013) que al comparar dos tratamientos superovulatorios en 20 vacas Holstein Friesian en la provincia de Chimborazo, T1 8FSH (total FSH 360mg; Folltropin-V) + eCG 400 UI y T2 8FSH (total FSH 360mg; Folltropin-V) sin eCG; encontró para el grupo de vacas tratadas con eCG+ FSH un promedio de cuerpos lúteos totales de $(6,2 \pm 2,80)$ y para el grupo de vacas tratadas solo con FSH 8.2 ± 3.16 ($p>0,05$). Tampoco obtuvo diferencias entre el número total de cuerpos lúteos derechos e izquierdos.

Esta variación podría atribuirse a la raza, condiciones climáticas, dosis de hormonas utilizadas y el número de animales estudiados. Respecto a las dosis hormonales Baruselli *et al.* (2011) al estudiar diferentes protocolos de superovulación con FSH en 24 vacas Nelore, encontró que el número total de cuerpos lúteos era similar entre el tratamiento 8FSH y 4FSH ($8,8 \pm 0.6$ vs $10,8 \pm 0.6$) respectivamente; mientras que el tratamiento con 2FSH disminuía el total de CL ($7,3 \pm 0,6$).

Calidad embrionaria (Grados)

Los resultados obtenidos en la calidad embrionaria del T2, se podría explicar posiblemente debido a la acción prolongada de la eCG que pudo inducir el crecimiento folicular en la primera onda después de la ovulación, lo que causa incremento en las concentraciones de estradiol en la sangre, un proceso que, a su vez, tiene efecto deletéreo en las etapas iniciales del desarrollo embrionario (Mogollón y Burla, 2013).

Embriones aptos para ser lavados- transferidos (número).

Baruselli *et al.* (2011) estudiaron la respuesta superovulatoria de vacas Nelore y Holstein. Los resultados obtenidos en las vacas Nelore sometidas a tratamientos de 8FSH; eCG 1500; 2000 y 2500 UI; que solo los grupos tratados con eCG y 8FSH presentaron número de embriones transferibles similares, mientras que las sometidas a dosis de 2500 UI de eCG presentaron mayor número de folículos anovulatorios. En las vacas Holstein con tratamientos de FSH 200mg; eCG 2000 y 2500 UI el número de embriones transferibles no fue significativamente diferente entre los grupos ($7,9 \pm 1,1$; $6,7 \pm 1,1$ y $8,1 \pm 0,7$) respectivamente.

En contraste Salinas (2013) obtuvo un promedio de $(1,9 \pm 1,97)$ embriones transferibles obtenidos en el tratamiento con FSH + eCG frente a $(2,7 \pm 1,78)$ embriones transferibles obtenidos en el tratamiento FSH.

Los resultados obtenidos son muy similares a los reportados por Vaca (2017), pero contrarios a los hallazgos de Betancourt y Caceres (2011) con respecto a los promedios en cada estadio.

La diferencia entre el número total de estructuras encontradas y el número de embriones transferibles puede corresponder al número de embriones Grado 3 (C) y al sesgo que puede crearse por el examinador de la calidad embrionaria. No obstante el efecto de la raza parece ser un factor importante a considerar para el estudio de la variable en cuestión.

Igualmente es importante hacer referencia a lo indicado por Medina (2014), que la mejor tasa de preñez, implantación y nacidos vivos se logra con transferencia de los embriones en estadio de blastocitos.

Etapas de desarrollo embrionario (estadios).

Respecto al estadio blastocisto, estos resultados difieren a los obtenidos por Salinas (2013) que reportó diferencia significativa entre los tratamientos hormonales sobre los blastocistos ($P < 0,05$). Siendo de tres blastocistos en las vacas tratadas con eCG + Folltropin y 12 en las sometidas a Folltropin. Según el autor estos resultados sugieren que al emplear la hormona FSH-p sola, los folículos emergentes del tratamiento para superovular no tienen el impulso suficiente para producir la ruptura de la teca folicular.

Con respecto a los estadios de mórulas y los ovocitos infertilizados, Salinas (2013) no encontró diferencias estadísticas ($P > 0,05$), tan igual que en la presente investigación.

Se infiere que lo sucedido en los resultados obtenidos se deba posiblemente a los niveles hormonales utilizados en cada tratamiento. Morales (2017) concluye en ovejas, que la mejor respuesta a la superovulación y a la producción de embriones se obtiene a mayor dosis de hormona (1500 UI de eCG Folligon vs 1000 UI eCG Folligon).

Relación costo/ beneficio

La rentabilidad de los tratamientos se observa en la Tabla 7, siendo eficientes en términos económicos ambos. Sin embargo, se evidencia una relación costo/beneficio favorable al tratamiento 1, a pesar que los egresos son mayores. Igualmente en este tratamiento se tiene una mayor cantidad de embriones viables, lo que consecuentemente produce un mayor ingreso (al precio del mercado), el cual alcanza una superioridad del 33,59% con respecto al tratamiento 2.

Conclusiones

Los protocolos hormonales utilizados bajo estas condiciones no afectaron estadísticamente las variables Tasa de ovulación (número de cuerpos lúteos), Calidad embrionaria (Grados), Embriones aptos para ser lavados- transferidos (número) y Etapas de desarrollo embrionario (estadios). Sin embargo, el grupo de vacas tratadas con 200mg FSH, presentaron una mejor rentabilidad a través de la relación costo/beneficio.

Referencias bibliográficas

- Balarezo, L; García, J; Hernández, M; García, R. (2016). Metabolic and reproductive state of Holstein cattle in the Carchi region, Ecuador. Cuban Journal of Agricultural Science. Vol. 50 (3): 381- 392 pp.
- Baruselli, P; Ferreira, R; Sales, J; Gimenes, L; Sá Filho, M; Martins, C; Rodrigues, C; Bó, G. (2011). Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. BR. Theriogenology. ELSEVIER. Vol. 76. p 1583–1593.
- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación. Sitio Argentino de Producción Animal. Consultado: 4 de Enero, 2018. Disponible: http://www.produccionbovina.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf
- Betancourth, J; Gabriel Cáceres, G. (2011). Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales. Trabajo de grado, Ing. Agronomos, Zamorano, Honduras. Consultado: 10 de Enero, 2018. Disponible: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/82/1/T3185.pdf>
- Bó, G; Mapletoft, R. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. BR. Animal Reproduction. Vol. 10. N.3. p 344-348.
- Colomo, S. (2015). Transferencia de embriones en bovinos. Monografía para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Coahuila, México. Consultado: 18 de diciembre 2017. Disponible: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7923>. pdf
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). (2015). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. (En línea). EC. Consultado: 7 de enero 2018. Formato PDF. Disponible en <http://www.ecuadorencifras.gob.ec>
- Medina, R. (2014). Transferencia de blastocistos es realmente lo ideal?. Consultado: 12 de Enero, 2018. Disponible: http://avemere.org.ve/pres/Transferir_embriones.pdf
- Mogollón, E; Burla, A. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. CO. Spei Domus. Vol. 9. N. 18. p 37- 47.
- Morales, M. (2017). Comparación de dos protocolos de superovulación utilizando diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (ECG) en la producción de embriones ovinos (Bachelor's thesis, Quito: UCE). 47p.
- Pérez, R; Carriquiry, M; Soca, P. (2007). Estrategias de manejo nutricional para mejorar la reproducción en ganado bovino. Cuzco, PE. Archivo Latinoamericano Producción Animal. Vol. 15: 14-115 pp.
- Salinas, D. (2013). Efecto de la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) en vacas donantes superovuladas con Folltropin-v (FSH-p liofilizada). Tesis. Mg. Sc. en Reproducción Animal. Universidad de Cuenca. Azuay, EC. p 27-47.
- Uffo, O. (2011). Producción animal y biotecnologías pecuarias: nuevos retos. La Habana, CU. Revista de Salud Animal. Vol. 33: 8-14 pp.
- Vaca Carrillo, M.A. (2017). Efecto de la calidad y cantidad de embriones bovinos en respuesta a dos protocolos para superovulación (Bachelor's thesis, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería Agropecuaria). Ecuador. 34p.

