

TASA DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS EN VACAS HOLSTEIN EN DESCARTE

OOCYTES RECOVERY RATE IN CULL HOLSTEIN COWS

¹Armando Enrique Alvarado Malca, ²Guiselle Gamarra, ³Amalia Gallegos y ⁴V. Samillán

Resumen

El objetivo de la investigación fue determinar la viabilidad de la técnica de recuperación de ovocitos vía vaginal por aspiración folicular, en vacas Holstein de descarte, así como determinar la viabilidad y calidad de ovocitos recuperados en estos animales que ya han finalizado su vida reproductiva. Se utilizaron cuatro vacas Holstein de descarte de 9 años de edad y buena condición corporal. Se realizaron 24 sesiones de aspiración folicular vía transvaginal, durante doce semanas, en dos sesiones por semana. Para la aspiración se usó un ecosonógrafo Parus 240 Pie Medical y un transductor multi ángulos sectorial MAP, de 5 – 7.5 MHZ y la ayuda de una bomba de vacío Cook. Se obtuvo un promedio de 4.2 ovocitos por sesión por vaca. El total de ovocitos recuperados fue de 403, los que de acuerdo a su calidad se clasificaron en: 47 ovocitos tipo A, 102 ovocitos tipo B, 235 ovocitos tipo C y 19 ovocitos tipo D. Los resultados se evaluaron mediante un diseño de bloques completamente al azar. Así mismo se determinó la correlación entre el total de ovocitos recuperados y el número de ovocitos tipo A y B (ovocitos viables). El coeficiente de correlación se sometió a la prueba de t. La técnica de recuperación de ovocitos es viable en vacas de descarte y se encontró un 36.97 % de ovocitos con alto potencial para la maduración y fertilización *in vitro*, correspondientes a los ovocitos tipo A y B.

Palabras clave: Ovocitos, ecosonógrafo, aspiración folicular

Abstract

The objectives of this research were the viability determinations of the technique of recovery of oocytes in cull Holstein cows by vaginal route, as well as the viability and quality of oocytes recovered in these reproducers to conclude their reproductive life. Four Holstein cull cows were used with 9 years old and good corporal condition. During twelve weeks 24 sessions of follicular aspiration via transvaginal were executed, in two sessions per week. Parus 240 Ultrasound Medical Foot was used and a sectorial transducer multiangles MAP, of 5 – 7.5 MHZ and the aid of an vacuum Cook. An average of 4.2 oocytes by session per cow was obtained applying the technique of transvaginal puncture-needle of ovarian follicles, being accumulated 403 oocytes that according to their quality were classified in: 47 oocytes A type, 102 oocytes B type, 235 oocytes type C and 19 oocytes D. type The 149 oocytes type A and B represent the 36,97% of the total of oocytes with potential for the maturation and fertilization *In Vitro*, transforming themselves into embryos to obtain a pregnancy. Data was evaluated with a randomized complete blocks design. Numbers of oocytes were correlated with the variable total numbers of viable oocytes and the correlation coefficient was tested by test

Keys words: Oocytes, ecosonograf, follicular aspiration

1. Introducción

Los avances en biotecnología animal a partir de la década de los años 80, se han visto favorecidos con el uso de ultrasonografía y las ventajas de esta tecnología se han ido relacionando con su aplicación en animales de interés productivo, permitiendo acortar los tiempos en la mejora genética, así como programar y organizar mejor los aspectos reproductivos y productivos, obteniendo consecuentemente un considerable ahorro y mayor relación beneficio-costos (Bellenda, 1998)

El desarrollo de la técnica de producción *in vitro* (PIV) de embriones, conlleva inicialmente, a la obtención de ovocitos, los mismos que son aspirados de los folículos ováricos con la ayuda del ecosonógrafo, instrumento que mediante la biotécnica del uso de ondas de ultrasonido de 1 a 10 Mega Hertz (MHZ), produce sonidos inaudibles para el oído humano (esta técnica fue desarrollada en el año 1970 para el diagnóstico del embarazo y anomalías fetales en medicina humana (Tamayo, 1998; Bellenda, 2002).

¹Departamento Producción Animal, Facultad de Zootecnia. UNALM E-mail: calvarado@lamolina.edu.pe

²Especialista del CIETE. E-mail: gcgamarra@gmail.com

³Departamento Producción Animal Facultad de Zootecnia UNALM E-mail: amgallegos@lamolina.edu.pe

⁴Estudiante EPG UNALM - Práctica privada

La superovulación y transferencia de embriones son actualmente las herramientas más usadas para multiplicar la genética de las hembras. Sin embargo, otra de las técnicas que se encuentran en constante perfeccionamiento es la fertilización *in vitro*, donde en gran número de laboratorios de investigación la fuente de ovocitos son ovarios de camal. En la década de los años 90 la ecografía guiada comenzó a utilizarse como método de colección de ovocitos bovinos en hembras vivas (Nivot, 2002; Bellenda, 2003; Moreira, 2003).

La técnica de imagen por ultrasonido, sin invasión del tracto reproductivo, ha hecho posible el estudio de la dinámica e interacción de la población folicular del ovario, visualizando folículos desde 2 a 3 mm., permitiendo el monitoreo cuantitativo así como su posterior desarrollo (Pierson y Giatherg, 1988; Pierson *et al.* 1998; Carvalho, 2003).

La colección de ovocitos es el paso fundamental para la aplicación de los procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV) y el establecimiento posterior de programas de producción de embriones *in vitro* (PIV) (Ramírez y Jiménez, 1997)

La Aspiración Transvaginal Ecoguiada por Ultrasonido (Ovum Pick Up: OPU) es una técnica muy usada en ganado bovino, se puede realizar en todos los estados del ciclo estral, durante los tres primeros meses de gestación y en animales prepúberes. Se puede practicar una o dos veces por semana durante periodos de 3 a 6 meses. Las ventajas de esta técnica es su fácil utilización en el campo, menor riesgo en la hembra y una menor invasión; su desventaja es el elevado costo del equipo y contar con personal capacitado para la punción. (Gregg y Domínguez, 2002; Hidalgo *et al.* 2002).

Para el presente trabajo de investigación se tiene los siguientes objetivos: Determinar la viabilidad de la técnica de recuperación de ovocitos en vacas Holstein en descarte, vía transvaginal, por punción folicular y determinar la viabilidad y calidad de ovocitos recuperados, para determinar su potencial de maduración y fertilización *in vitro*.

2. Materiales y métodos

Lugar de Ejecución. El trabajo experimental se llevó a cabo en el establo lechero del Centro Agropecuario Lima, Unidad de Producción del Servicio de Veterinaria del Ejército del Perú, ubicado en el Distrito de San Juan de Miraflores, al sur este de la ciudad de Lima, relieve ondulado, clima templado, con temperaturas medias entre 18° a 19°C, altitud de 154 m.s.n.m., latitud sur 12° 02' 36" y longitud oeste 77°01'42".

Metodología Experimental. Aplicación del método de colección transvaginal de ovocitos, utilizando el

ecosonógrafo y el transductor tipo sectorial – MAP. La adecuación de las instalaciones para realizar la aplicación de la técnica de aspiración folicular fue diseñada, con guillotina y piso escalonado.

Animales experimentales. Se contó con 04 vacas en descarte cuya edad promedio fue de 09 años, con 05 a 06 partos y en buena condición corporal y sanitaria. El trabajo se ejecutó durante doce (12) semanas, comprendiendo 24 sesiones de colección (2 sesiones por semana). A la visualización de los ovarios y folículos no se encontró diferencia fundamental con vacas en actividad reproductiva y productiva.

Material y Equipo en el Campo. Ecosonógrafo Parus 240 PIE MEDICAL, Transductor de multiángulo sectorial MAP, de 5 – 7.5 MHZ, con un ángulo de incidencia hacia abajo y adelante para una fácil exploración reproductiva, es utilizado especialmente para la colección de ovocitos con el adaptador vaginal, guía de aguja, bomba de vacío Cook; Promazil: tranquilizante, Lidoveto: anestésico local (Lidocaína 2%), algodón, jeringas de 5 ml., agujas hipodérmicas N° 18 x 1 ½“ Terumo (para aplicación de fármacos), agujas hipodérmicas N° 19 x 2“ Terumo (para punción folicular), alcohol, solución fisiológica, hojas de afeitar, jabón desinfectante, papel toalla, plumón marcador negro (indeleble), extensión para energía eléctrica 25 mt. , guantes Sensigan 25 GO14 caja x 100 unidades, mandil, botas de jebe, tubos de centrifuga de 50 ml. , baldes con agua.

Material y Equipo en el Laboratorio. Estereoscopio MEIJI, aumento 25x, para calidad 45x -60x, placas etri 100 mm. , placas etri 35 mm., unopet de 20 ul., micropipetas de 1 ml con adaptadores, puentes para micropipetas 10 ul. , medios para aspiración de ovocitos, solución fisiológica 9%, heparina (Heparin Sodium Cell, Sigma H 3149 Lot. -023 K0928), Kanamicina (Kanamicin Monofosfate K 1377, Lot 112 K-10725).

Procedimiento en campo: La vacas fueron colocadas en un brete para realizar la inspección ginecológica para determinar si la vaca está limpia; se le aplicó 3 ml. De tranquilizante (Promazil-**R**); luego se evacuó el contenido fecal. Se lavó con agua y jabón desinfectante la zona lumbo-sacra y se aplicó anestésico local vía epidural (5 ml de Lidocaína-**R**). Enseguida se hizo limpieza de la zona perineal, labios vulvares y desinfección con torunda empapada en alcohol y se evaluó la flacidez deseada en la cola, como resultado de la aplicación del anestésico local.

Colección de Ovocitos: En cada sesión se tomó en cuenta sincronizar la operatividad del ecosonógrafo con el sistema vaginal-transductor y la bomba de aspiración, trabajando con una presión de vacío que osciló entre -36 a -49 mm de Hg (Fase Experimental y con las conexiones a los tubos). Una vez verificado el orden de todos los equipos se procedió a la aspiración, siguiendo la secuencia programada. Se ubicó por palpación rectal uno

de los ovarios y se procedió a identificar en la pantalla del monitor los folículos, cuerpo lúteo, estroma ovárico. Se orientó el ovario para visualizar el folículo a aspirar, en la línea orientadora observada en el monitor y se procedió a empujar la aguja atravesando la pared vaginal para llegar al ovario y punzar el folículo previsto, aspirando el contenido del mismo, continuando sucesivamente en todos los folículos de ese ovario. Se procedió de manera idéntica con el otro ovario. En la línea de biopsia del monitor, se penetró y manipuló la aguja con movimientos suaves y precisos que permitieron la máxima evacuación de fluidos celulares. Al mismo tiempo se verificaba que la línea de silicona que lleva los fluidos al tubo de colección no tenga interrupciones. Al manipular cada ovario, se tuvo que constatar el material y equipo, considerando un tubo colector para cada uno de ellos, con medio de aspiración, cambio de aguja y limpieza de las guías de aspiración. Se repitió la limpieza cada vez que se detectó contaminación con sangre o se observó obstrucciones. Los tubos de colección se acondicionaron para ser trasladados al laboratorio para el filtrado y búsqueda de ovocitos.

Procedimiento en el Laboratorio: Filtración de ovocitos con solución fisiológica más heparina, utilizando filtro ENCOM de 70 u, colocando el sedimento en placas Petri de 100 mm. (base cuadrículada) para la búsqueda de ovocitos. En la búsqueda se utilizó estereoscopio con aumento de 40 x. La clasificación se hizo de acuerdo a la calidad en grados A, B, C y D (Liebfriend *et al* 1989, Vivanco, 2001). Grado A: Ovocitos con más de tres (3) capas de células de cúmulo ooforo, citoplasma color uniforme sin pigmento.

Grado B: Ovocitos de 1-3 capas de células de cúmulo ooforo completas o incompletas, citoplasma uniforme. Grado C: Ovocitos sin células de cúmulo ooforo, citoplasma pigmentado. Grado D: Ovocitos con células de cúmulo maduro fibrosado, citoplasma negrozco pigmentado.

Diseño estadístico: En el presente estudio se utilizó el diseño de bloques completos al azar.

Siendo el modelo aditivo lineal:

$$X_{ij} = \mu + \beta_i + T_j + e_{ij}$$

i = 1, 2 ... 4
j = 1, 2 ... 24

Donde:

x_{ij} : Valor de la cantidad de ovocitos recuperados en una sesión determinada (bloque) a una vaca determinada (tratamiento).

μ : Media, constante desconocida.

β_i : Representa la cantidad, o unidad experimental que cayó en el *i*-ésimo bloque.

T_j : Representa la cantidad o unidad experimental que recibió el *j*-ésimo tratamiento.

e_{ij} : Componente residual que representa todas las fuentes de variación que no sean los tratamientos y los bloques

Suponemos que los T_j y β_i son un conjunto de constantes fijas, por tanto se tiene una situación que se ajusta al modelo de efectos fijos:

Según esto puede probarse:

H_0 : $T_j = 0, j = 1, 2, \dots, K$.

Contra la alternativa:

H_a : no todos los $T_j = 0$

Sea α : 0.05:

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza. Así mismo se determinó la correlación entre la variable número total de ovocitos y la variable número total de ovocitos viables de grado A y B. El coeficiente de correlación se sometió a la prueba de *t*

3. Resultados y discusión

Folículos aspirados y Ovocitos Obtenidos

Tal como muestra en la tabla 1 el experimento se ejecutó en cuatro vacas (04) Holstein de descarte. Se realizaron un total de 716 aspiraciones foliculares y un promedio de 179 aspiraciones foliculares por vaca. Asimismo, se verificó la obtención de 403 ovocitos, con un promedio de 100.75 ovocitos por vaca.

En el presente trabajo con la modalidad de dos (02) sesiones de colección por semana se logró 14.9 aspiraciones foliculares y 8.4 ovocitos, cifras menores a las obtenidas por Bellenda (2003), Gruggerhoff, *et al.* (2002), con 46 folículos aspirados y 18.8 ovocitos recogidos.

Tabla 1. Tasa de recolección de ovocitos en 24 sesiones de punción folicular.

Vaca donante arete	Resultado aspiración folicular				Observaciones							
	Total folículos aspirados	Ovocitos obtenidos			Tipo de ovocitos							
		Cantidad	%	A	%	B	%	C	D	%		
220995	177	100	56.5	3	3	22	22	63	63	12	12	
251095	172	101	58.7	11	10.9	22	21.8	68	67.3	0	0	
301195	203	119	58.6	17	14.3	30	25.2	69	58	3	2.5	
351195	164	83	50.6	16	19.3	28	33.7	35	42.2	4	4.8	
TOTAL	716	403	56.3	47	11.7	102	25.3	235	58.3	19	4.7	

En cuanto a la calidad de ovocitos obtenidos se registró lo siguiente: 47 ovocitos tipo A (11.66%), 102 ovocitos tipo B (25.31%), 235 ovocitos tipo C (58.31%) y 19 ovocitos tipo D (4.71%), tomando como referencia la morfología del citoplasma y las células del cúmulo, aspectos sobre los que coinciden Leibfried *et.al* (1989), Ramírez y Jiménez (1997) y Vivanco (2001) , al afirmar que el fundamento para discriminar entre ovocitos competentes e incompetentes para el desarrollo embrionario radica en la morfología del citoplasma y la calidad de las células del cúmulo.

Respecto a la cantidad de ovocitos obtenidos se registró un promedio de 4.2 ovocitos por sesión, por vaca, por debajo de lo registrado por otros autores, como Hidalgo, *et. al* (2003) que obtuvieron 6.8 ovocitos por sesión por vaca. Vivanco (2001), sin estimulación hormonal obtuvo de 6 a 12 ovocitos por vaca donante por sesión, aunque puede haber variación de acuerdo a la raza, edad y condición nutricional entre otros factores. Se obtuvo un número menor a Bellenda (2003) quien reportó un promedio de 9.4 ovocitos por vaca por sesión. Aller *et al* (2000) obtuvieron en promedio 10.1 ovocitos por sesión empleando la misma técnica (aspiración folicular). Asimismo, por debajo de los resultados de 6.1 ± 0.6 en una aspiración por semana, registrado por Nolan y Goodhand citados por Bruggerhoff *et al* (2002).

Los menores niveles obtenidos se pueden deber a factores tales como:

- a. Diferentes niveles de presión de vacío utilizado durante la aspiración folicular (36 - 49 mm. de Hg.). E igualmente, las tasas de recuperación de ovocitos de calidad, puede estar asociada a efectos traumáticos sobre las capas de las células de los cúmulos, ejercidos por la fuerza de aspiración.

En la punción transvaginal de folículos es oportuno considerar que los niveles de presión de vacío utilizados durante la aspiración folicular afecta no solo la tasa de recuperación de ovocitos, sino también la calidad de estos (Bellenda 1998). El incremento de la presión de vacío aumenta el número de ovocitos inviabilizados, posiblemente por la pérdida de células de los cúmulos que rodea al ovocito. La presión utilizada fue menor ya que otros investigadores, aplicaron una aspiración constante de 85 mm. de Hg. (equivalente a un flujo de aspiración de 14 ml. de agua por minuto) (Hidalgo *et al.* 2002).

- b. La Heparina es una sustancia que evita la formación de coágulos que engloban los complejos cúmulos ovocitarios. La concentración de heparina, utilizada en el medio de recogida y el tiempo de contacto de estos con los ovocitos fue de 3 – 4 horas.

De acuerdo a la recomendación de la técnica, la concentración de Heparina sería entre 2 y 5 UI/ml y un tiempo de contacto con los ovocitos de no menos de una (01) hora. En el desarrollo del presente trabajo

hubo una variación entre 4 y 5 UI/ml. Sin embargo al ser insuficientes las concentraciones convencionales de heparina, es posible doblar la cantidad a 10 UI/ml, al mismo tiempo que se intenta reducir al máximo el tiempo de permanencia de los Cúmulos Celular Ovocitarios (CCOs) en el tubo de recogida, lo que permitirá una buena tasa de recuperación de ovocitos, tal como lo afirma Hidalgo *et al.* (2002).

- c. Preparación de vacas donantes de descarte (alimentación).

En la preparación de las vacas donadoras en descarte se les administró la alimentación normal del establo, aunque es recomendable frente a una baja producción de ovocitos procesables con respecto a los estándares normales, estimular hormonalmente a la donante a fin de aumentar la disponibilidad de folículos aspirables y la cantidad de ovocitos recolectados (Vivanco, 2000^a; Moreira, 2003; Gregg *et al.*, 2002)

- d. Desarrollo ovocitario en cuanto a edad, tamaño y calidad de los cúmulos celular ovocitario.

Los folículos sometidos a punción estaban en promedio de 2 mm. de diámetro por ser los más indicados, ya que tamaños menores a éstos, los ovocitos recuperados tendrían problemas, en su desarrollo posterior en el laboratorio (Ramírez y Jiménez, 1997).

- e. Es importante señalar la ventaja costo-beneficio entre las técnicas de OPU (ovum pick up) y MOET (superovulación y transferencia de embriones), considerando la mención que al respecto hace Vivanco (2000b), que con la técnica de OPU se obtiene 160 embriones por año, comparado con 30 embriones, por vaca, por año con MOET. En el presente trabajo se obtuvo 149 ovocitos viables, si consideramos lo encontrado por Cutrini *et al.* (2000) que para embriones *In Vitro*, el porcentaje de preñez es del 40 % , potencialmente podríamos contar con 59 embriones por vaca por año.

En relación a la Tabla 2 se ha tomado en consideración 3 variables de importancia: El número total de folículos aspirados, el número total de ovocitos obtenidos y el número de ovocitos viables, tipo “A” y “B”.

Tabla 2. Ovocitos grados A y B viables y con potencial para desarrollar embriones por fertilización *in vitro* (FIV).

Vaca descarte arete	Total folículos aspirados	Total ovocitos obtenidos	Ovocitos viables para FIV			
			A	B	Total	%
220995	177	100	3	22	25	17
251095	172	101	11	22	33	22
301195	203	119	17	30	47	32
351195	164	83	16	28	44	30
TOTAL	716	403	47	102	149	100

- En cuanto al número de folículos aspirados, se realizó la punción transvaginal en promedio de 179 folículos por vaca, obteniendo 100.75 ovocitos por vaca en promedio y la obtención de 4.2 ovocitos por sesión por vaca.
- Respecto al número de ovocitos viables “A” y “B”, tomando como referencia los protocolos de clasificación mencionados anteriormente, cabe mencionar que la diferencia anatómica estructural determinada por la calidad de las envolturas celulares que rodea el ovocito y la apariencia del citoplasma, son los mejores indicadores del potencial que éste posee para la maduración y fertilización *in vitro*. Asimismo, las células del cúmulo que rodean al ovocito, son subpoblaciones de células de la granulosa que tienen como función proveer de nutrientes al ovocito durante el crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida, sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto, y permite atraer al espermatozoide en el proceso de fertilización. Los ovocitos “A” y “B” son formas inmaduras que necesitan desarrollar y madurar artificialmente para poder ser fertilizados, a diferencia del óvulo que es un ovocito maduro (proceso de ovulación natural) y listo para ser fertilizado. De los grados de clasificación en general se considera que solamente los ovocitos de grado “A” y “B” poseen un elevado potencial para el desarrollo de embriones por fertilización *in vitro*, sin embargo el porcentaje de viabilidad de los ovocitos “A” y “B” para ser fertilizados, transformarse en embriones y lograr una preñez, está en los rangos de 24% a 54% (Cutrini *et al.* 2000). Para embriones *in vitro* el porcentaje de preñez en promedio es de 40%, agregando que la morfología y la química son afectados por las condiciones en que se desarrollan los embriones (Cutrini *et al.* 2000).
- Encontramos también que las vacas N° 220955 y la vaca N° 251095 juntas tuvieron 349 aspiraciones foliculares, obteniéndose 201 ovocitos, de los cuales 58 ovocitos fueron viables; las vacas N° 301105 y N° 351105 tuvieron 367 aspiraciones foliculares obteniéndose 202 ovocitos de los cuales 91 ovocitos fueron viables. Esta diferencia puede deberse a factores intrínsecos a la técnica que influyen sobre el rendimiento final tales como: material ecográfico, sistema de aspiración, características de la aguja. (ecogenicidad, diámetro externo e interno y bisel), presión de aspiración. Experiencia del operador y frecuencia de aspiración (Bellenda, 1998).
- Asimismo, existe una fuerte influencia materna sobre el número y calidad de ovocitos obtenidos por sesión. Su capacidad para dar blastocistos luego de la fecundación y cultivo *in vitro* está fuertemente influenciada por elementos maternos almacenados en el ovocito, Kruij *et al.* (1994), Gibson *et al.* (1995), citados por Hidalgo *et al.* (2002).
- La heparina utilizada como anticoagulante debe usarse en concentraciones de 2 y 5 UI/ml. aconsejándose que el tiempo de contacto con los ovocitos no supere una hora, es posible que la alta concentración de heparina

mezclada con el medio de recogida sea perjudicial sobre la capacidad de desarrollo del ovocito (Hanzen y Goffin, 1998, citados por Hidalgo *et al.*, 2002).

Como el valor calculado de t es menor que el valor crítico de t , se acepta la hipótesis nula y se concluye que la variable, número total de ovocitos obtenidos, no está correlacionada con la variable número total de ovocitos viables, pese a que son vacas de un mismo estable, contemporáneas en edad, el mismo régimen alimenticio y tratadas en el experimento bajo las mismas condiciones, lo que hace suponer que las diferencias en la obtención de una menor cantidad de ovocitos viables tengan que ver con los factores intrínsecos comentados en la tabla 3 así como a factores maternos e individuales que influyen en la cantidad y en la calidad de ovocitos obtenidos.

Tabla 3. Correlación entre ovocitos obtenidos y ovocitos viables.

24 Sesiones	Total De Ovocitos Obtenidos	Total de Ovocitos Viables	X ²	Y ²	XY
	X	Y			
Vaca 220995	100	25	10000	625	2500
Vaca 251095	101	33	10201	1089	3333
Vaca 301195	119	47	14161	2209	5593
Vaca 351195	83	44	6889	1936	3652
Total	403	149	41251	5859	15078

4. Conclusiones

Es viable y aplicable la técnica de recuperación de ovocitos en vacas Holstein de descarte vía transvaginal, habiéndose encontrado que el 36.97 % de ovocitos correspondiente a la clasificación A y B son viables y competentes para maduración y desarrollo embrionario, mientras que el 63.02 % correspondieron a la clasificación C y D.

5. Literatura citada

- Aller J.F., Alverio R.H., Palma J.A. 2000. Gestación con Embriones Producidos *in vitro* a partir de Ovocitos Recuperados de Vacas Ovariectomizadas. Grupo de Biotecnología de la Reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Balcarce – Argentina, Arch. Med. Vet. V.31.N1.
- Bellenda O. 1998. La Ecografía Aplicada a la Reproducción en especies de interés reproductivo Escuela de Veterinaria de la Universidad de Glasgow . En: <http://www.ecografiavet.com>. pag. 1-6.
- Bellenda O. 2002. Aplicaciones de la ecografía en el manejo reproductivo del ganado lechero. En: <http://www.ecografiavet.com>. pag. 1-10.

Bellenda O. 2003. La ecografía aplicada a la reproducción en especies de interés productivo – Parte 2 <http://www.ecografiavet.com>. pag 1 -12.

Bruggerhoff; Katja, Zakhartchenko, V.; Wenigerkind, H. 2002. Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Using Recipient Oocytes Recovered by Ovum Pick Up: Effect Of Maternal Lineage of Oocyte Donors. Rev. Society for the Study of reproduction, Inc 66, 367-373 (2002) Pag. 1-15, Ludrieny-Maximilian University – Germany.

Cutrini A.; Teruel M. y Cabdevilla J. 2000. Factores que determinan al resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. Rev. Taurus N° 7 Pag. 1,2,4,12 Buenos Aires - Argentina.

Carvalho D. 2003. Ultrasonografía Na Reproducao Animal. Rev. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriones. pag. 3-10 Brasil.

Gregg P.; Adans, Miguel A. Dominguez. 2002. Aplicaciones del ultrasonido en la reproducción Bovina Western College Of Veterinary Medicine, University Of Saskatchewan, Canada.

Hidalgo C.; Fernandez P. D. N. Facal, y E. Diaz, J.M. Prendes, J. Menéndez. 2002. Primeros terneros producidos *in vitro* tras punción ecogiada de folículos ováricos. SERIDA – CENSYRA, Gijón – España.

Leibfried M.L. Britser E.S., Parrish J.L. Fertil N° 1. 1989. “*In Vitro* maturation und fertilization C/ bovine Oocytes Theriogenology. – 31:6174.

Moreira J. 2003. “Expectativas e Limitacoes da Puncão Folicular na Recuperacao de Ovocitos para Producao *in vitro* de Embriones” Rev. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriones. Pag. 7-10 Brasil.

Nivot A. 2002. Nuevas Técnicas al Servicio de la Reproducción de Ganado Vacuno. Revista Digit @ 1 > Investigación. Toros de Lidia.com – Octal Madrid. España.

Pierson R.A. and O.J. Giatherg.1988. Ultrasonic Image of The Ovaries And Uterus In Cattle. Department Of Veterinary y Science University Of Wisconsin. Vol. 29 N° 1 – Pag. 21.

Pierson R.; J.P. Kartelic, and O.J.Giatherg. Basic Principles And Techniques For Transrectal Ultrasonography y In Cattle And Horses. 1998. Theriogenology 29: 3-19.

Ramírez O., Jiménez C. 1997. Métodos de Recolección de Oocitos”. Universidad Nacional Autónoma de Méjico.

Tamayo M. 1998. La Ecografía como Medio de Diagnóstico y Evaluación de los Procesos Reproductivos en el Bovino. Boletín PIE MEDICAL, Pag 1-8 Universidad Agraria La Habana -Cuba.

Vivanco W. 2000a. Intensive reproduction of Cow Of High Genetic Merit Using Ovum Pick Up (OPU) By Transvaginal Recovery (TUR) and *in vitro* Embryo Production (IVP). Ruakura Research Center – Hamilton Neo Zeland. Pag. 1-3

Vivanco W. 2000b. Comparative Advantages of IVP vs MOET. Ruakura Research Center. Pag. 1-4.

Vivanco W. 2001. Protocolos y Procedimientos

Operatorios Técnicos para la Colección de Ovocitos por Método Transvaginal en Bovinos. Informe técnico. Pag. 1-13 Lima-Perú.