

**Análisis de perfusión sanguínea del cuerpo
lúteo vs viabilidad embrionaria en vacas
donadoras de ganado de carne**

Lohana Fernández Montero

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Análisis de perfusión sanguínea del cuerpo lúteo vs viabilidad embrionaria en vacas donadoras de ganado de carne

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Lohana Fernández Montero

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Análisis de perfusión sanguínea del cuerpo lúteo vs viabilidad embrionaria en vacas donadoras de ganado de carne

Lohana Fernández Montero

Resumen. La perfusión sanguínea es definida como la diferencia en flujo sanguíneo al pasar por un tejido. Ésta medida porcentual calculada a través de un ultrasonido con el método Power Doppler al cuerpo lúteo de las vacas posee una relación directa con el volumen de progesterona (P₄). Siendo esta hormona la responsable de establecer y mantener la preñez también es un componente que afecta el comportamiento de los embriones. La viabilidad embrionaria es un factor poco predecible y variante en la superovulación de vacas de ganado de carne. Debido a ello, el estudio pretende reconocer una correlación entre viabilidad embrionaria en una superovulación y la perfusión sanguínea de un cuerpo lúteo. El procedimiento se llevó a cabo en la clínica de transferencia de embriones Ovagenix™ en Texas, el cual consistió en realizar un ultrasonido al cuerpo lúteo de las vacas para determinar el flujo sanguíneo con el programa ImageJ Software, a priori del protocolo de superovulación. Se comparó el dato sanguíneo con el número de embriones totales, viables y la relación entre ambos. Perfusión sanguínea vs número total de embriones no mostró correlación ($r = -0.06154$; $P = 0.8209$), tampoco viabilidad embrionaria ($r = -0.04619$; $P = 0.8651$), ni la relación entre ambos factores vs flujo sanguíneo ($r = -0.00218$; $P = 0.9936$). Estableciendo que la perfusión sanguínea del cuerpo lúteo tomada antes del protocolo de superovulación, no es factor determinante relacionado a la viabilidad embrionaria al momento del lavado y no debe ser utilizado como toma de decisiones para someter una vaca al protocolo de superovulación.

Palabras clave: Flujo sanguíneo, ImageJSoftware, Power Doppler, superovulación.

Abstract. Blood perfusion is defined as the difference of blood flow occurred inside a tissue. This percentage measured through an ultrasound performed with the Power Doppler mode to the *corpus luteum* of the cows, has a direct relation with the volume of progesterone (P₄). This hormone is the one responsible for stablishing and maintaining pregnancy, and for being an aspect that affects embryo behavior. Embryo viability is an unpredictable and variable factor within the superovulation of beef cows. For this reason, the study aims to recognize a correlation between embryonic viability in a superovulation and the blood perfusion of a *corpus luteum*. The procedure was carried out in the embryo transfer clinic Ovagenix™ in Texas, which consisted of performing an ultrasound to the *corpus luteum* of the cows to determine blood flow with the program ImageJ Software, a priori of the superovulation protocol. The blood flow data was compared with the number of total and viable embryos, and with the relation between both. Blood perfusion vs total number of embryo showed no correlation ($r = -0.06154$; $P = 0.8209$), neither embryo viability ($r = -0.04619$; $P = 0.8651$), nor the relation between both variable vs blood flow ($r = -0.00218$; $P = 0.9936$). Establishing that the blood perfusion of the *corpus luteum* taken before the superovulation protocol is not, a determining factor related to embryonic viability at the flushing day and should not be use as a decision making to undergo a cow through the protocol.

Key words: Blood flow, ImageJ Software, Power Doppler, superovulation.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	12
5. RECOMENDACIONES.....	13
6. LITERATURA CITADA	14

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Datos recolectados en el lavado de embriones de los distintos grupos de vacas donadoras y análisis de perfusión sanguínea de las imágenes de los cuerpos lúteos con la utilización del software ImageJ	8
2. Datos de correlación entre perfusión sanguínea en el cuerpo lúteo vs número total de embriones, número total de embriones viables y número total de embriones de acuerdo al número total de embriones viables	9

Figuras	Página
1. Línea de tiempo de protocolo para celo de referencia.....	5
2. Línea de tiempo de protocolo de superovulación.....	6
3. Correlación visual de las variables perfusión sanguínea vs número total de embriones	10
4. Correlación visual de las variables perfusión sanguínea vs número total de embriones viables	10
5. Correlación visual de las variables perfusión sanguínea vs número total de embriones de acuerdo al número total de embriones viables	11

1. INTRODUCCIÓN

Tecnologías reproductivas tales como la Inseminación Artificial (IA) y la Transferencia de Embriones (TE) han sido establecidas mundialmente debido a su efectividad al momento de optimizar, no solo aspectos reproductivos, también genéticos de ganado lechero y de carne (Colazo y Mapletoft 2007). El uso de tecnologías embriónicas es una herramienta para mejorar la genética de una especie gracias a la accesibilidad que esta provee para el estudio de la transgénesis y el genotipo (Galli *et al.* 2003) y la manipulación de genes deseables. La IA permite el acceso global a genes encontrados dentro del semen (Vishwanath 2003). La utilización del semen deseado, una correcta manera de inseminación y la transferencia de embriones, permite el mejoramiento de la ventana entre partos, así como de intervalos generacionales más rápidos (Marshall y Minyard 2002).

Durante las últimas cuatro décadas la expansión de la TE ha desarrollado más estudios (Betteridge 2003). A pesar de que en años anteriores la TE fue vista como una manera de obtener ganado de carne “exótico” (Hasler 2003), hoy en día este aspecto no ha sido mayormente permutado, tomando como referencia al ganado “exótico” como ganado de alta genética y no su antigua versión considerada como ganado de otros continentes. Obtener tales estándares de genética en un gran número de progenies al mismo tiempo, ha sido el principal objetivo de esta tecnología (Youngs 2007).

El éxito en una transferencia de embriones reside en técnicos previamente capacitados en las bases tecnológicas implicadas en este protocolo, tales como sincronización, IA y superovulación (Selk 1992). El promedio de producción de embriones por cada vaca donadora después de la superovulación es de seis embriones (Seidel y Seidel 1991; Barros y Nogueira 2001), sin embargo, el 20% de las vacas que emprenden este procedimiento no llegan a producir embriones viables (Hasler 2004). Adicionalmente, la viabilidad de los embriones resultantes no siempre son los requeridos para un trasplante exitoso, por ello, encontrar una manera productiva para incrementar este número es imperativa.

Estudios previos afirman que la súper ovulación y la transferencia de embriones puede ser afectada por la no fertilización, degeneración, problemas fisiológicos de los órganos, el folículo (Armstrong 1993) o la cantidad de lavados repetitivos en una misma vaca (Bastidas y Randel 1987). No obstante, investigaciones adicionales deben ser dirigidas a la funcionalidad del Cuerpo Lúteo (CL). La perfusión sanguínea tiene una correlación directa con la cantidad de progesterona (P_4). Considerando que la P_4 juega un rol crucial en la mortalidad embrionaria temprana (Green *et al.* 2005), la perfusión sanguínea del CL debería poseer de igual manera un rol importante en este aspecto.

La perfusión sanguínea es definida como la diferencia entre el volumen de sangre arterial y venosa dentro de un mismo tejido (Schrope y Newhouse 1993). El estudio de este flujo está siendo usado ampliamente en distintas áreas en el campo de la ciencia. En ganado de carne y lechero, ejemplos como los siguientes pueden ser encontrados: el estudio del flujo sanguíneo en arterias fundamentales, el ciclo estral (Ford *et al.* 1979), tejidos (Briers 2001) y aspectos relacionados a la preñez como los folículos y el CL (Acosta *et al.* 2003).

El CL es una de las glándulas primordiales responsable de la producción de P₄, una hormona destacada por ser la responsable de establecer y mantener la preñez (Schams y Berisha 2004). El CL bovino es característico por desarrollar y someterse a múltiples cambios debido a la angiogénesis y vascularización en un periodo relativamente corto de tiempo (2-3 días) (Miyamoto *et al.* 2009). Tales alteraciones repentinas del folículo preovulatorio desarrollan un sistema capilar complejo dependiente de una alta cantidad de flujo sanguíneo constante para funcionar. Por esta razón, el CL es una de las glándulas del cuerpo que posee la mayor cantidad de flujo sanguíneo por unidad de masa (Skarzynski *et al.* 2013). Adicionalmente, el estudio de este flujo sanguíneo ha demostrado una correlación positiva para la determinación de la fisiología y concentraciones de P₄ del CL (Lüttgenau y Bollwein 2014). Por ejemplo, un mal funcionamiento del CL conducirá en su mayoría a una mayor mortalidad embrionaria (Thatcher *et al.* 1989) y complicaciones indeseables en el ciclo estral (Ayalon 1978), ocurriendo una alteración en las tasas de gestación.

La ultrasonografía transrectal es un método utilizado para evaluar la teriogenología involucrada en animales como el ganado gracias a sus prácticas no invasivas por el recto (Rajamahendran *et al.* 1994). Su expansión e investigación instigó a la invención de la ultrasonografía Doppler. Ésta usa las diferencias en frecuencia originadas de la dirección e intensidad del flujo sanguíneo (efecto Doppler) para lograr medir la velocidad en un volumen y área determinado (Matsui y Miyamoto 2009). Un método derivado de este proceso es el Power Doppler, el cual facilita mayormente la investigación, manejo y perspectiva de los órganos y tejidos. Esta técnica permite mapear con distintos colores de anaranjado la intensidad de la perfusión sanguínea concentrada en un área específica (Herzog *et al.* 2010). Estudios previos han demostrado que en relación a las características de tamaño, formación y vascularización encontrado en el CL, la ultrasonografía Power Doppler es una fuente más confiable y no invasiva para estimar la funcionalidad y medir la perfusión sanguínea del mismo (Miyazaki *et al.* 1998; Acosta *et al.* 2003).

El desarrollo de estos métodos requirió inicialmente del puntaje mediante una evaluación visual. La evaluación visual consta de técnicos previamente entrenados que asignan un puntaje a las imágenes de los CL (Samper *et al.* 2007) frecuentemente en porcentajes. Estudios concluyeron que la evaluación visual y los análisis computacionales poseen resultados estrechamente relacionados (Utt *et al.* 2009; Guimarães *et al.* 2015). Dichos análisis fueron creados con el fin de erradicar el error humano al momento del puntaje. El Instituto Nacional de la Salud (NIH) creó un software para el análisis de imágenes llamado ImageJ (Schneider *et al.* 2012). Con su programación el software es capaz de medir, mediante la cuantificación de los píxeles presentes en las imágenes Power Doppler tomadas por medio de un ultrasonido en cada CL (Ginther y Utt 2004), la perfusión sanguínea.

- Evaluar la existencia de una relación directa entre el volumen de perfusión sanguínea de un cuerpo lúteo de referencia de una vaca donadora vs el porcentaje de embriones viables obtenido de un lavado.
- Determinar si la evaluación de la perfusión sanguínea de un cuerpo lúteo antes del protocolo de superovulación, es factor determinante para realizar o no una superovulación a una vaca donadora de ganado de carne.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue llevado a cabo durante los meses de febrero y marzo en las instalaciones de Ovagenix™ en el Rancho Marble, Iola, Texas, con una altitud de 90 msnm, un promedio de temperatura de 19.4 °C y 1,043 mm de lluvia al año.

Un total de 19 vacas fueron utilizadas, las cuales fueron separadas en dos grupos debido a fechas de protocolos de sincronización establecidos por el calendario reproductivo de la clínica. Todos los animales se encontraban bajo el mismo programa privado de nutrición dirigido por el rancho Marble. El primer grupo consistió de siete vacas pura raza Wagyu las cuales comenzaron su proceso el 12 de febrero del 2018. El segundo grupo consistió de 10 vacas entre las razas Wagyu, Maine, Angus Rojo y Brangus Rojo las cuales comenzaron su proceso el 25 de febrero del 2018.

Ambos grupos de vacas fueron sometidas al mismo método de sincronización para un celo de referencia y luego a un protocolo de superovulación.

Protocolo para Celos de Referencia (Figura 1). El comienzo del protocolo para el celo de referencia fue establecido como día -16, así mismo dando a conocer los días restantes para el inicio del protocolo de superovulación. El día -16 consistió en implantar un CIDR® (Eazi-breed™ CIDR® inserción intravaginal de progesterona) junto con 2 mL de COMBO (Progesterona-Estradiol 17β) a cada vaca equivalentes a 25 mg/mL de progesterona y 1.25 mg/mL de estradiol. Siete días después de este proceso, en el día -9, el CIDR® (Eazi-breed™ CIDR® inserción intravaginal de progesterona) se removió y se aplicaron 5 mL de la hormona luteolítica (Lutalyse® injection dinoprost tromethamine) equivalentes a 5 mg de dinoprost trometamina/mL. En el día -8, 1mL de estradiol (Estradiol 17β in oil Med Shop Total Care, Inc.) se inyectó, considerado con una dosis de 1mg de estradiol por cada mL. Seguidamente, en el día -7 se observó el celo de referencia esperado en el transcurso del día en cada vaca.

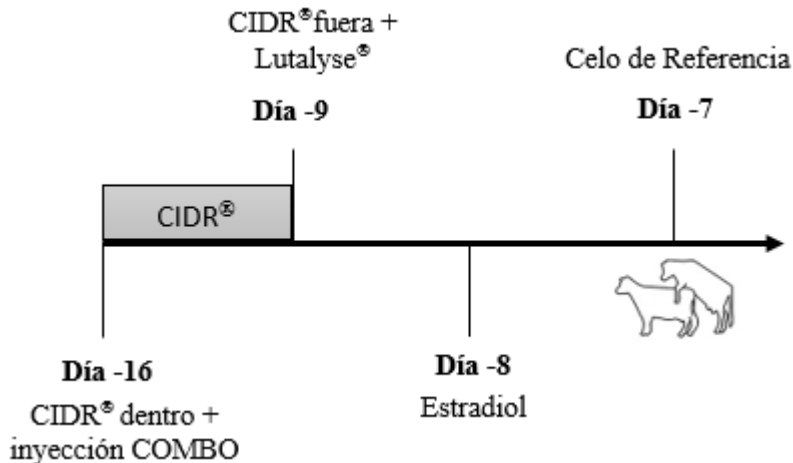


Figura 1. Línea de tiempo de protocolo para celo de referencia

Protocolo de Superovulación (Figura 2). El día 0 se define como el día en que el protocolo de superovulación da inicio. Un CIDR® (Eazi-breed™ CIDR® inserción intravaginal de progesterona) se introdujo en cada vaca a la misma vez que se les aplicó 2mL de COMBO (progesterona-estradiol 17β Med Shop Total Care, Inc.) equivalentes a 25 mg/mL de progesterona y 1.25 mg/mL de estradiol. En el día 4 se les inyectó una dosis de solución de hormona folículo estimulante (FSH*) (Folltropin® dual pack) comenzando con la dosis más alta y descendiendo con el transcurso de los días en la mañana y en la tarde estimulando en cada vaca el 100% de respuesta a la hormona. El mismo procedimiento se efectuó en el día 5. Durante el día 6 se inyectó de nuevo la FSH* (Folltropin® dual pack) junto con 2 mL de Prostaglandina F_{2α} (Estrumate®), introduciendo de esa manera una cantidad de 0.25 mg/mL de cloprostenol tanto en la mañana como en la tarde. En el día 7 se removió el CIDR® (Eazi-breed™ CIDR® inserción intravaginal de progesterona) y se administró la última dosis de FSH* (Folltropin® dual pack) durante la mañana. El día 8 consistió en aplicar 2 mL de GnRH (Hormona liberadora de gonadotropina) equivalentes a 43 mcg/mL de gonadorelina, en la mañana y se realizó la inseminación artificial durante la tarde. El mismo procedimiento de inseminación artificial se efectuó en el día 9 en la mañana, finalizando así el proceso de reproducción. En el día 15, considerado el día final, se llevó a cabo la recolección de embriones de cada vaca donadora.

*Dosis de FSH (Folltropin® dual pack) varían en cada vaca de acuerdo a datos de recolecciones de embriones previas (desempeño), raza y edad.

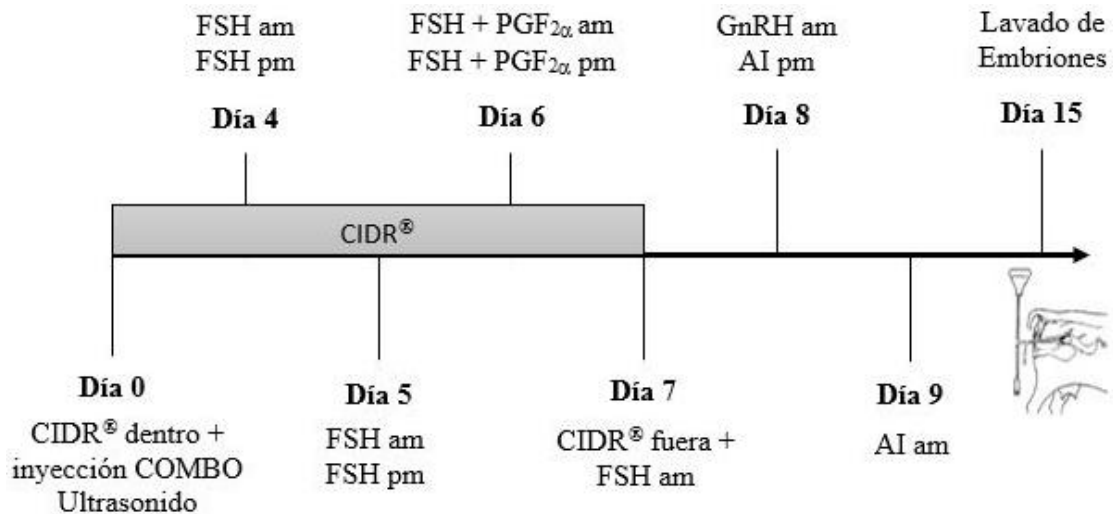


Figura 2. Línea de tiempo de protocolo de superovulación.

Un ultrasonido transrectal se realizó al día 0 del protocolo de superovulación (CIDR® dentro), logrando así examinar los ovarios y localizar el Cuerpo Lúteo (CL). Utilizando el modo Power Doppler para acceder a visualizar el flujo sanguíneo del CL, tomando y guardando dos imágenes por vaca para ser posteriormente analizadas.

En el día 15 del protocolo de superovulación, cada vaca se sometió a un procedimiento no quirúrgico conocido como lavado. Un catéter de silicona (Bardia® foley catheter 5 mL balloon) se introdujo dentro de la vagina de la vaca, pasando por la cérvix y llegando hasta el cuerpo del útero mientras una palpación por el recto se realizó para asegurar el proceso. El catéter se adhirió a un set de tubos y a un filtro (SPI™ ez-way filter w/y long foley). Una solución de Lactato de Ringer (Vedco® veterinary lactated ringer's injection, USP) mezclada con otra solución de albúmina (ICPbio Reproduction™ albumin solution, 20% w/v), se introdujeron dentro del cuerpo del útero, permitiendo el lavado de los embriones del interior del aparato reproductor de la vaca (cuernos uterinos) hacia el filtro, el cual se llevó al laboratorio donde se lavó con una solución de enjuague (Vigro® rinsing) especial para el mantenimiento del embrión. Los embriones se identificaron según su condición (no fertilizados, degenerados y viables) dentro de un 6 well dish (SPI™ 6 – well cluster dish); el cual contenía una solución que permite crear un ambiente aún más estable para los embriones (Vigro® holding plus). En este mismo paso los embriones viables fueron separados y clasificados según su grado y etapa.

Análisis de Imagen. Se condujo un análisis computacional para medir la cantidad total de perfusión sanguínea en un CL específico, en porcentajes siendo 0% el nivel con menor perfusión sanguínea y 100% con el mayor flujo sanguíneo. El software utilizado fue ImageJ (versión 1.51w, US National Institutes of Health, Bethesda, MD) el cual utilizó un análisis de píxeles de la imagen para lograr un puntaje computarizado según el área del cuerpo lúteo. Para el estudio se utilizó un análisis de correlación entre las variables porcentaje de perfusión sanguínea del cuerpo lúteo, número total de embriones, número total de embriones viables y la relación entre el número total de embriones de acuerdo al número total de embriones viables. Para realizar el análisis estadístico se empleó el método

estadístico “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4[®] 2013) con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Flujo sanguíneo (perfusión sanguínea) vs número total de embriones.

La relación entre flujo sanguíneo del cuerpo lúteo mediante un ultrasonido en el día 0 (al comienzo de la superovulación) mostró una correlación baja ($r = -0.06154$; $P = 0.8209$) con el número de embriones totales encontrados al momento del lavado de los mismos al día 15 del protocolo de superovulación (Cuadro 1 y 2); (Figura 3). Estos resultados son respaldados por estudios realizados por Breuel *et al.* (1991) en donde se detallan factores más importantes como lo son la raza y la edad en el efecto de respuesta en la superovulación que el estado del cuerpo lúteo al inicio del protocolo de sincronización. De igual manera Mojtaba *et al.* (1997) y Mapletoft *et al.* (2002a) recalcan estos factores, así como la no presencia de un folículo dominante y factores extrínsecos como lo son: temporada, ambiente y lactancia.

Cuadro 1. Datos recolectados en el lavado de embriones de los distintos grupos de vacas donadoras y análisis de perfusión sanguínea de las imágenes de los cuerpos lúteos con la utilización del software ImageJ.

Fecha	Código	Perfusión Sanguínea (%)	# Total de Embriones	# Total de Embriones Viables
13/02	87X	43	19	11
13/02	44W	50	16	14
13/02	30W	38	11	11
13/02	59X	28	13	8
13/02	92X	56	7	3
13/02	I205	41	10	0
13/02	52W	50	6	6
28/03	71X	10	16	12
28/03	307Z	8	18	7
28/03	I924F	31	29	13
28/03	026I	23	8	7
28/03	33X	32	7	0
28/03	101X	44	29	9
28/03	12X	21	1	1
28/03	72X	50	3	3
28/03	BAILEY	27	2	2
Media		34.5	12.2	6.7

Cuadro 2. Datos de correlación entre perfusión sanguínea en el cuerpo lúteo vs número total de embriones, número total de embriones viables y número total de embriones de acuerdo al número total de embriones viables.

		Perfusión Sanguínea	# Total de Embriones	# Total de Embriones Viables	R
Perfusión Sanguínea	r	1.00000	-0.06154	-0.04619	-0.00218
	P		0.8209	0.8651	0.9936

R= Relación de perfusión sanguínea vs número total de embriones de acuerdo al número total de embriones viables

r= Correlación

P= Probabilidad

Flujo sanguíneo (perfusión sanguínea) vs número total de embriones viables.

La relación entre flujo sanguíneo del cuerpo lúteo mediante un ultrasonido en el día 0 (al comienzo de la superovulación) no mostró correlación ($r = -0.04619$; $P = 0.8651$) con el número de embriones viables encontrados al momento del lavado de los mismos al día 15 del protocolo de superovulación (Cuadro 2); (Figura 4). Estos resultados son respaldados debido a estudios que reconocen más la importancia del estado de los folículos (ondas foliculares); es decir, que no se encuentre un folículo dominante al momento del inicio del protocolo de superovulación, que el estado del cuerpo lúteo para aumentar el número de embriones viables (Adams 1994; Singh *et al.* 2004). De igual modo, estudios realizados por Folch *et al.* (2001) demostraron que en ovejas la aplicación de progesterona exógena ayuda al mejoramiento en calidad de los embriones colectados. Mismos estudios realizados en bovinos por Nasser *et al.* (2011) reafirman estos resultados. Sin embargo, estos detallan el mejoramiento al utilizar la progesterona ya como método dentro del protocolo de superovulación y no reconocen algún efecto de esta hormona proveniente del cuerpo lúteo natural de la vaca antes del protocolo.

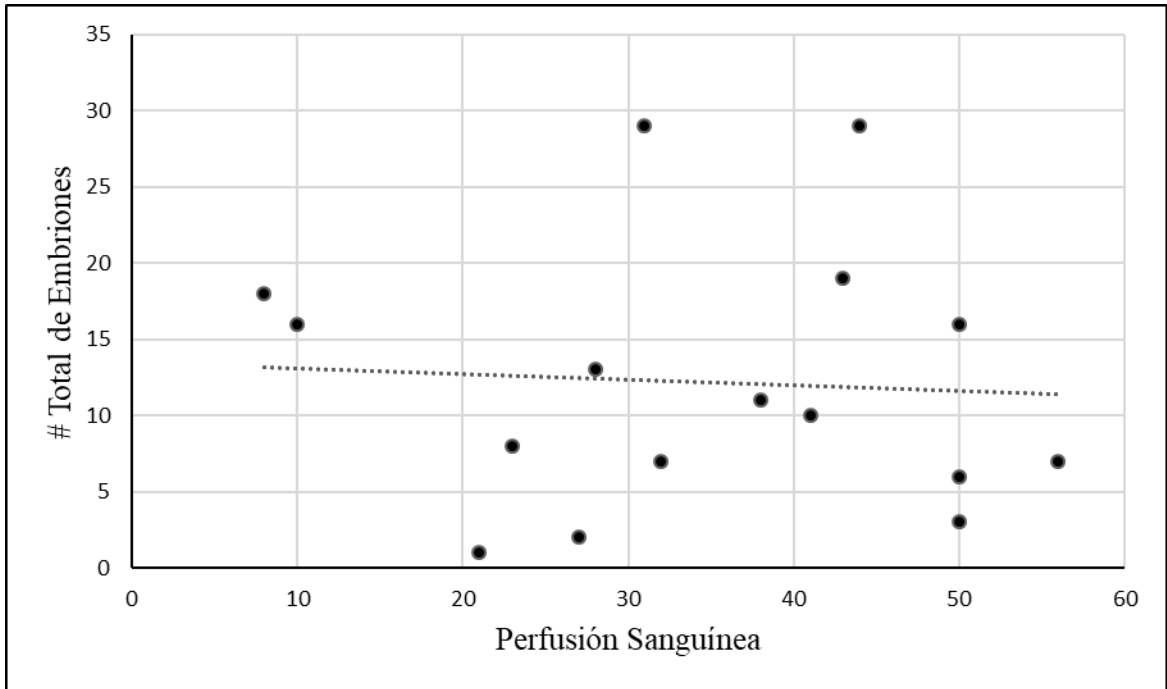


Figura 3. Correlación visual de las variables perfusión sanguínea vs número total de embriones.

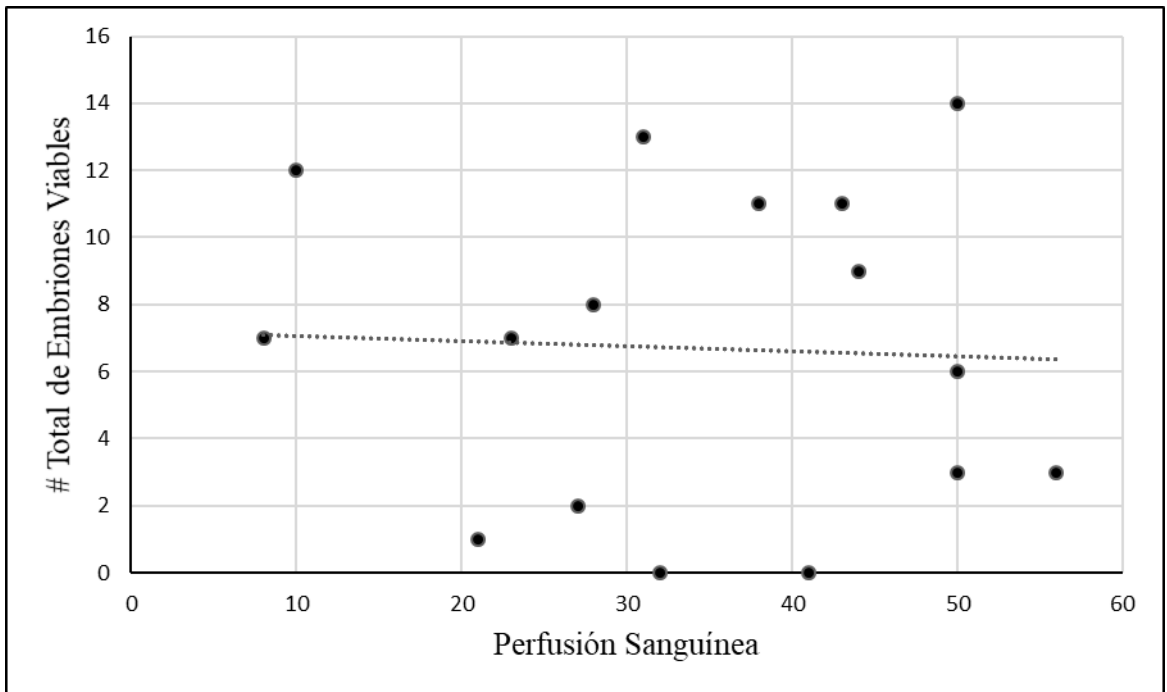


Figura 4. Correlación visual de las variables perfusión sanguínea vs número total de embriones viables.

Flujo sanguíneo (perfusión sanguínea) vs número de embriones viables de acuerdo al número total de embriones.

La relación entre flujo sanguíneo del cuerpo lúteo mediante un ultrasonido en el día 0 (al comienzo de la superovulación) no mostró correlación ($r = -0.00218$; $P = 0.9936$) con el número de embriones viables de acuerdo al número total de embriones encontrados al momento del lavado de los mismos al día 15 del protocolo de superovulación (Cuadro 2); (Figura 5). En la 18^{va} conferencia científica de la Asociación de Tecnología Embrionaria en Europa, Mapletoft *et al.* (2002b) recalcan sobre la variabilidad en efectividad y calidad embrionaria comparada con el número total de embriones, en la cual exponen que no se encuentran relaciones directas entre estos componentes. Dicha mención es respaldada por factores como lo son los inherentes al animal y los expresados debido al medio ambiente que los rodea y se encuentran relacionados al momento del protocolo de superovulación como tal y no antes del mismo como lo fue la toma de la perfusión sanguínea del cuerpo lúteo antes del proceso de superovulación. Así mismo, Baruselli *et al.* (2006) exponen nuevamente que la relación entre el número de embriones viables de acuerdo al número total de embriones varía significativamente entre donadoras y no depende solo de un factor como lo es la perfusión sanguínea del cuerpo lúteo.

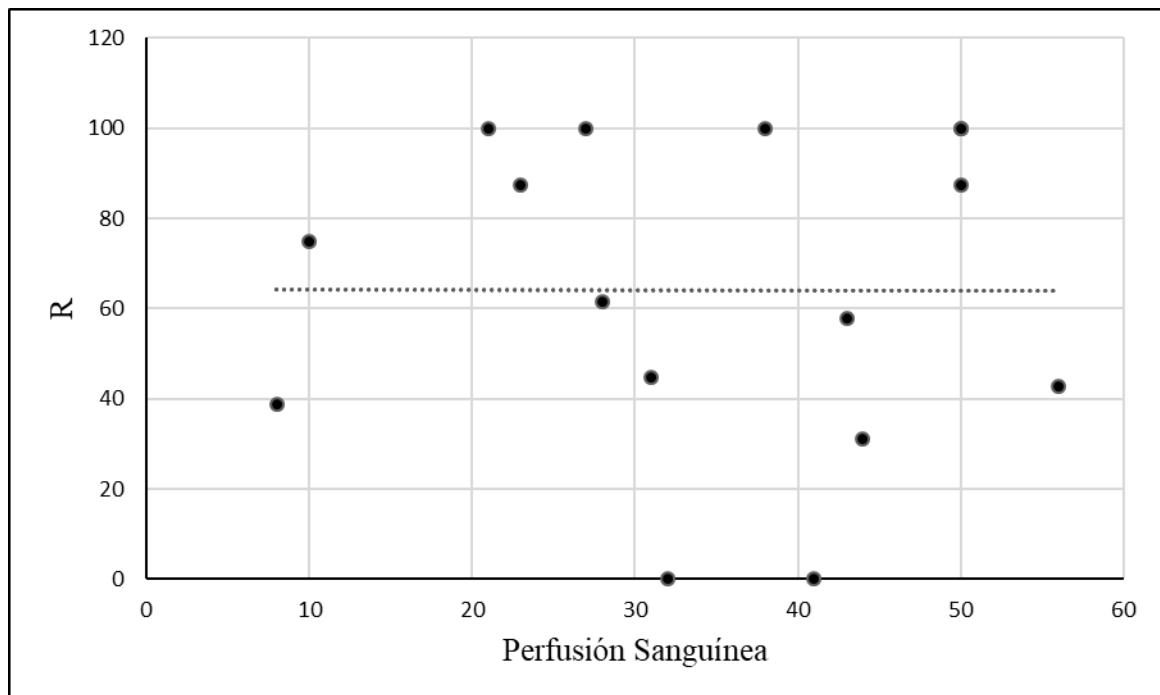


Figura 5. Correlación visual de las variables perfusión sanguínea vs número total de embriones viables de acuerdo al número total de embriones.

4. CONCLUSIONES

- La evaluación de la perfusión sanguínea del cuerpo lúteo de referencia al día 7 siendo este equivalente al día 0 del protocolo de superovulación, no es factor determinante para predecir tanto el número de embriones totales como la viabilidad embrionaria al momento de colectar los embriones en vacas donadoras de ganado de carne.
- El porcentaje de perfusión sanguínea del día en que inició el protocolo de superovulación no es un factor determinante para tener éxito al someter una vaca donadora de ganado de carne al proceso de superovulación para recolectar embriones.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar futuros experimentos con un mayor número de vacas donadoras de ganado de carne para determinar si el número de vacas influye en los resultados del análisis.
- Realizar otros estudios en los cuales se separen los animales según raza, edad, lactantes y no lactantes, para identificar posible correlación entre estas variables.
- Repetir el estudio en diferentes épocas del año en donde las condiciones del tiempo no estén alteradas por cambios drásticos en el clima.

6. LITERATURA CITADA

- Acosta T, Hayashi K, Ohtani M, Miyamoto A. 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*. 125(5):759–767.
- Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A. 2002. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ α injection in the Cow. *Biology of Reproduction*. 66:651–658.
- Adams GP. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology*. 41:19-24.
- Armstrong DT. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*. 39(1):7–24.
- Ayalon N. 1978. A review of embryonic mortality in cattle. *Reproduction and Fertility*. 54(483-493):11.
- Barros CM, Nogueira MFG. 2001. Embryo transfer in *Bos indicus* Cattle. *Theriogenology*. 56:1483–1496.
- Baruselli PS, Sá Filho MF de, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bó GA. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 65(1):77–88.
- Bastidas P, Randel RD. 1987. Effects of repeated superovulation and flushing on reproductive performance of *Bos indicus* cows. *Theriogenology*. 28(6):827–835.
- Betteridge KJ. 2003. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim Reprod Sci*. 79:203–244.
- Breuel KF, Baker RD, Butcher RL, Townsend EC, Inskeep EK, Dailey RA, Lerner SP. 1991. *Theriogenology*. 36(2):241-266.
- Briers JD. 2001. Laser doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiological Measurement*. 22:R35-R36.

- Colazo MG, Mapletoft RJ. 2007. Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*. 9(1):20–37.
- Del Campo MR, Rowe RF, French LR, Ginther OJ. 1977. Unilateral relationship of embryos and the corpus luteum in cattle. *Biology of Reproduction*. 16:580–585.
- Folch J, Ramon JP, Cocero MJ, Alabart JL, Beckers JF. 2001. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology*. 55:1777-1765.
- Ford SP, Chenault JR, Echtenkamp SE. 1979. Uterine blood flow of cows during the oestrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. *Reproduction and Fertility*. 56:53–62.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 59(2):599–616.
- Ginther OJ, Utt MD. 2004. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *Journal of Equine Veterinary Science*. 24(12):516–526.
- Green MP, Hunter MG, Mann GE. 2005. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 88(3-4):179–189.
- Guimarães CRB, Oliveira ME, Rossi JR, Fernandes CAC, Viana JHM, Palhao MP. 2015. Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. *Theriogenology*. 84(2):237–241.
- Hasler JF. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci*. 79(3-4):245–264.
- Hasler JF. 2004. Factors influencing the success of embryo transfer in cattle. *World Biomaterial Congress (WBC)*. Canada, 11-16 Julio 2004. Bogart, Georgia: Bioniche Animal Health USA, Inc.
- Herzog K, Brockhan-Lüdemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H. 2010. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*. 73(5):691–697.
- Lüttgenau J, Bollwein H. 2014. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color doppler ultrasonography. *Reprod Biol*. 14(2):103–109.

- Mapletoft RJ, Bennett K, Adams GP. 2002a. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*; [consultado 2018 jun 29] 42(6):601-611. <https://rnd.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/2002/07/R2605Mapletoft.pdf>
- Mapletoft RJ, Bennett K, Adams GP. 2002b. 18th AETE Scientific Meeting. Rolduc, 06-07 septiembre. Kerkrade, Holanda: Association of Technology in Europe. <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/2002/file>
- Marshall DM, Minyard MA. 2002. Embryo transfer in beef cattle. South Dakota: South Dakota University. https://www.researchgate.net/publication/21645204_Embryo_transfer_in_cattle?enrichId=rgreq-00fd7a4845252479184d067da1bd3cb0-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzIxNjQ1MjA0O0FTOjEwNDg3NjM1MjczNzI4M0AxNDAYMDE1ODc5MTk3&el=1_x_3&_esc=publicationCoverPdf
- Matsui M, Miyamoto A. 2009. Evaluation of ovarian blood flow by colour doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. *Vet J.* 181(3):232–240.
- Miyamoto A, Shirasuna K, Sasahara K. 2009. Local regulation of *corpus luteum* development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Domest Anim Endocrinol.* 37(3):159–169.
- Miyazaki T, Tanaka M, Miyakoshi K, Minegishi K, Kasai K, Yoshimura Y. 1998. Power and colour doppler ultrasonography for the evaluation of the vasculature of the human *corpus luteum*. *Human Reproduction.* 13(10):2836–2841.
- Mojtaba K, McGowan MR. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Theriogenology.* 48(2-4):137-157.
- Nasser LF, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CL, Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS. 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology.* 76(2):320-327.
- Rajamahendran R, Ambrose DJ, Burton B. 1994. Clinical and research applications of real-time ultrasonography in bovine reproduction: A review. *Canadian Veterinary.* 35:563–572.
- Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO. 2007. Current therapy in equine reproduction. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier. ISBN: 978-0-7216-0252-3.

- Schams D, Berisha B. 2004. Regulation of *corpus luteum* function in cattle--an overview. *Reprod Domest Anim.* 39(4):241–251.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9(7):671–675.
- Schrope BA, Newhouse VL. 1993. Second harmonic ultrasonic blood perfusion measurement. *Ultrasound in Medicine & Biology.* 19(7):567–579.
- Seidel GE, Seidel Sarah M. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle: Superovulation [Superovulatory Treatments] [internet]. Fort Collins, Colorado: Colorado State University; [consultado el 2 de mar. de 2018]. <http://www.fao.org/docrep/004/T0117E/T0117E04.htm>.
- Selk G. 1992. Embryo transfer in cattle. *Tierärztliche Praxis*; [consultado 2018 mar 28] 20(1):6. https://www.researchgate.net/publication/21645204_Embryo_transfer_in_cattle?enrichId=rgreq-00fd7a4845252479184d067da1bd3cb0-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzIxNjQ1MjA0O0FTOjEwNDg3NjM1MjczNzI4M0AxNDAYMDE1ODc5MTk3&el=1_x_3&_esc=publicationCoverPdf.
- Singh J, Domínguez M, Jaiswal R, Adams GP. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology.* 62(1-2):227–243.
- Skarzynski DJ, Piotrowska-Tomala KK, Lukasik K, Galvão A, Farberov S, Zalman Y, Meidan R. 2013. Growth and regression in bovine corpora lutea: regulation by local survival and death pathways. *Reprod Domest Anim.* 48 Suppl 1:25–37.
- Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M. 1989. Concepts for regulation of *corpus luteum* function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology.* 31(1):149–164.
- Utt MD, Johnson GL, Beal WE. 2009. The evaluation of *corpus luteum* blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology.* 71(4):707–715.
- Vishwanath R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology.* 59:571–584.
- Youngs C. 2007. Embryo transfer in beef cattle. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Montana, 11 y 12 septiembre 2007. Iowa, Estados Unidos de América: Animal Science Department, Iowa State University.