

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS”

MONOGRAFÍA

Por:

PÉREZ LÓPEZ MIGUEL ANGEL

Como requisito parcial para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México. Junio de 2011

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL



MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

TORREON, COAHUILA

JUNIO DE 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL



MONOGRAFÍA

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MIGUEL ANGEL PÉREZ LÓPEZ

ASESOR:

MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

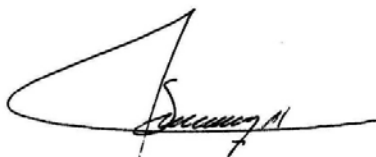
DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL

MONOGRAFIA

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

APROBADO POR EL COMITÉ

PRESIDENTE DEL JURADO



MVZ RODRIGO I. SIMON ALONSO

**COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE
CIENCIA ANIMAL**



MVZ. RODRIGO I. SIMON ALONSO



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL

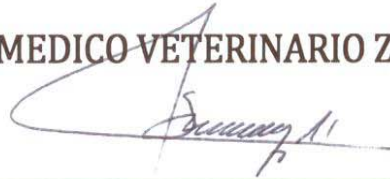
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

MONOGRAFIA

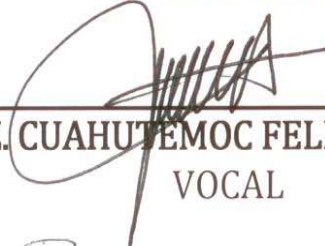
POR
MIGUEL ANGEL PEREZ LOPEZ

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

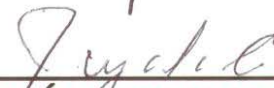
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA



MVZ RODRIGO I. SIMON ALONSO
PRESIDENTE



MVZ. CUAHUTEMOC FELIX ZORRILLA
VOCAL



MC. JOSÉ DE JESUS QUEZADA AGUIRRE
VOCAL



IZ. JORGE H. BORUNDA RAMOS
VOCAL SUPLENTE

DEDICATORIA

A **mis padres Francisco y Ermila** por que hicieron a que las cosas todo sea posible, por el apoyo incondicional, su amor y tolerancia, por que me dieron el regalo maravilloso que es la vida y compartir risas y tristezas con una maravillosa familia que formaron y por haberme acompañado en este largo camino para que este día llegara y por que se que lo seguirán haciendo en todo momento. **Gracias los Amo**

A **mis hermanos y hermanas: Tommy, Manuel, Javier, Juan Carlos, Cheli, Daniela y Yoli** que también son mis amigos que siempre has estado conmigo dándome palabras de aliento para seguir adelante y haciéndome ver que las cosas no son imposibles de lograrlos.

A **mi hermano Francisco** que ha estado en mi corazón y que ha sido mi razón para seguir adelante y ver que las cosas se pueden lograr, se que desde el cielo me ve y con sus lindas sonrisas me ha dado las fuerzas necesarias para seguir adelante. **Te quiero mucho hermano en donde quiera que estés**

A **mis abuelos** que de alguna manera han sido parte de este largo camino recorrido y que siempre se han preocupado por mí

A **mis Tíos: Luis, Claudio, Dionisio y Mariano** que siempre me apoyaron moralmente en los momentos que lo requerí y que siempre han estado pendiente de mí

A **todas** y cada una de las personas que de una u otra forma contribuyeron para lograr llegar en la cima que hasta hoy lo estoy logrando

AGRADECIMIENTO

A **Dios** por tener una hermosa familia lo cual ha sido fundamental durante mi carrera para llegar a este día y por que me ha permitido superar obstáculos durante este largo camino

A **Mis padres** por todo el apoyo moral, espiritual y económico, y por su entrega total como padres maravillosos que se han sacrificado, desvelado y esforzado para salir adelante en todo momento

A la **Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”** por abrirme las puertas para mi formación profesional y lograr ser alguien en la vida que me permita enfrentar las cosas en campo laboral con los conocimientos adquiridos

A **mis profesores** que fueron parte fundamental en mi formación profesional y por brindarme su conocimiento de cada uno de ellos

Al **Medico Rodrigo Simón** por ser un ejemplo para mi y por que siempre he recibido apoyo tanto académico y moralmente en los momentos que lo necesite

A **mis asesores** por ser parte esencial durante el trabajo de investigación con el apoyo incondicional

A **mis amigos** que de una u otra manera fueron parte de mi formación, conviviendo, haciendo tareas, desvelándose estudiando y haciéndonos reír en todo momento.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
RESUMEN	VI
1. Introducción	1
1.1 Técnica de transferencia de embriones	2
1.2 Selección de donadoras	3
1.2.1 Manejo de las vacas donadoras	4
1.2.2 Superovulación de la vaca donante	4
1.3 Selección de receptoras	5
1.3.1 Manejo de vacas receptoras	6
1.3.2 Preparación de las vacas para la transferencia	6
1.3.3 Nutrición e intervalo postparto	7
1.3.4 Sincronización de receptoras	7
1.4 Superovulación	8
1.4.1 Importancia clínica antes de comenzar un programa de superovulación	11
1.5 sincronización de estros	11
1.6 Método adecuado para el manejo del celo	13
1.6.1 Detección de celos	14
1.6.2 Índice de eficiencia en detección de celos	15
1.7 Conservación de embriones	16
1.7.1 Crioprotectores	16
1.7.2 Vitricificación de embriones	17
1.7.3 Congelación de embriones	18

1.8 Descongelación de embriones	19
1.9 Aspiración folicular transvaginal	20
2. Inseminación	21
2.1 Inseminación a tiempo fijo	22
2.1.1 Finalidad de la aplicación de la técnica de OMTE	23
2.1.2 Grado de clasificación de embriones	24
2.2 Obtención o colección de embriones	25
2.2.1 Método quirúrgico	26
2.2.2 Método no quirúrgico	27
2.3 Sincronía donante-receptora o estadio del embrión y receptora	27
3. preparación de los materiales para la transferencia	28
3.1 Cargar las pajillas con los embriones	29
3.2 Colocando la pajilla en la pipeta de transferencia	30
3.3 Procedimiento de la transferencia de embrión	32
4. Conclusión	33
Referencias bibliográficas	34

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Carga de embriones en la pajilla	30
FIGURA 2: Forma de colocar la pajilla con el embrión con el aplicador	32

RESUMEN

La transferencia de embriones es una técnica para el mejoramiento genético del ganado que actualmente está siendo muy difundida en nuestro país, debido a los buenos resultados obtenidos.

La transferencia de embriones está dentro de un marco de mejoramiento genético y se puede hacer tanto en fresco como también en forma congelada. El trabajo consiste en superovular vacas élite de alta producción, para poder multiplicar esa genética.

La superovulación de la vaca permite que ésta, en vez de ovular una sola vez y producir un embrión por año, con la estimulación produzca mayor cantidad de óvulos, que puede así llegar a los 10 ó 12. Posteriormente, se insemina a las vacas, y 7 a 8 días después, los profesionales encargados del protocolo de trabajo se encargan de realizar la colecta de embriones.

El desarrollo de protocolos efectivos de sincronización de la ovulación para evitar la detección de celos en programas de inseminación artificial (IA), conocidas como programas de IA a Tiempo Fijo (IATF), ha permitido la inseminación masiva de vacas y vaquillonas. Esto atraído como consecuencia el desarrollo de métodos de sincronización de la ovulación para facilitar la transferencia de embriones en forma sistemática o también llamada transferencia embrionaria a tiempo fijo (TETF).para esto es necesario controlar el desarrollo folicular y la ovulación.

Palabras claves: Transferencia, embrión, inseminación, superovulación, sincronización.

INTRODUCCIÓN

La transferencia embrionaria en ganado bovino ha estado comercialmente disponible por más de tres décadas. Actualmente esta técnica es extensamente utilizada en todo el mundo. El éxito de un programa de transferencia de embriones se mide por el número de terneros que nacen vivos por hembra donante en un determinado lapso de tiempo. Esto está influenciado por los factores relacionados con el número de ovulaciones, la fertilización y viabilidad de los embriones y aquellos relacionados con el manejo de las donantes y receptoras. Uno de los puntos críticos de la técnica de transferencia de embriones es el alto costo por receptora preñada. La tasa de concepción varía entre un 40 a 70% dependiendo del uso de embriones fresco o congelados (Àvila., 2007).

Uno de los factores que ha impedido la utilización masiva de la técnica de transferencia de embriones es la detección de celos, principalmente en el ganado *Bos indicus*. El desarrollo de protocolos efectivos de sincronización de la ovulación para evitar la detección de celos en programas de inseminación artificial (IA), conocidas como programas de IA a Tiempo Fijo (IATF), ha permitido la inseminación masiva de vacas y vaquillonas. Esto atraído como consecuencia el desarrollo de métodos de sincronización de la ovulación para facilitar la transferencia de embriones en forma sistemática o también llamada transferencia embrionaria a tiempo fijo (TETF). Para esto es necesario controlar el desarrollo folicular y la ovulación. Hoy existen diferentes tratamientos hormonales para la sincronización del desarrollo folicular y la ovulación, tales como es el uso del estradiol y progestágenos, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), o la hormona luteinizante (LH) (Celestinos. y Gatica., 2002).

1.1. Técnica de transferencia de embriones.

La transferencia de embriones es un procedimiento en el cual los embriones son recuperados de donantes superovuladas y transferidos dentro del tracto reproductivo de hembras receptoras que servirían como madre sustituta. Mediante estímulos hormonales es posible modificar la tasa de ovulación de una hembra y aumentar la cantidad de óvulos fértiles producidos en un ciclo estral (López., 2005).

La técnica de la transferencia de embriones consiste en recolectar del útero de la hembra donadora él o los embriones, clasificarlos, empacarlos y congelarlos o pasarlos en fresco al útero de una o más hembras receptoras que servirán de incubadoras exclusivamente de ese embrión y que se encuentra con los mismos días de ciclo sexual que la donadora para que coincidan la edad del embrión con los días de haber ovulado y se pueda llevar a cabo el reconocimiento materno fetal (Rodríguez. y Fernández., 2001).

La calidad del embrión y el estado de desarrollo embrionario. Cuando se congelan embriones de calidades muy buenas, se obtienen mejores resultados que cuando se congelan aquellos de calidad regular. La etapa del desarrollo más apropiada para la vitrificación de embriones es mórula compacta a blastocisto expandido, siendo más sensibles a las bajas temperaturas los embriones producidos *in Vitro* (Celestinos. y Gatica., 2002).

La necesidad de disponer de un gran número de embriones en estadios tempranos, y el desarrollo de la producción *in vitro* de embriones. Por tal razón, se evalúan diferentes condiciones y medios de cultivo *in vitro* de los oocitos buscando optimizar el proceso de maduración, ya que estos pueden afectar la correcta formación del huso acromático, generando alteraciones cromosómicas; lo cual es contraproducente en la producción *in vitro* de embriones (Urrego. *et al.*, 2005).

Para la aplicación de la técnica de transferencia de embriones es necesario la utilización de algunos procedimientos fisiológicos que se han clasificados de la siguiente forma:

- Selección de la donante.
- La superovulación.
- Detección del celo e inseminación artificial (de la donante).
- Obtención (colección de embriones).
- Lavado, búsqueda y manipulación de embriones.
- Selección de embriones y sincronización de las receptoras.
- Transferencias de embriones.
- Evaluación de los resultados de la transferencia.

1.2. Selección de donadoras.

La elección de hembras donadoras se realizará teniendo en cuenta su valor genético y en base de las aptitudes productivas de cada raza. Las hembras deben al menos de haber tenido una cría (Gibbons. y Cueto., 1995).

El valor de la donadora puede ser definido de acuerdo a diferentes criterios según los beneficiarios. Sin embargo, en el caso de la aplicación práctica de la técnica para el mejoramiento genético del ganado, debemos escoger a las vacas más productivas como donadoras. Además, estas vacas, deben de cumplir con los siguientes requisitos (Ávila., 2007):

- No presentar enfermedades hereditarias.
- Tener excelente historial reproductivo y salud.
- Alto valor en el mercado.
- Ciclos estrales regulares.
- No tener enfermedades que afecten la fertilidad.
- No ser demasiado viejas.

1.2.1 Manejo de las vacas donadoras.

La alimentación adecuada de su donante es fundamental si se van a producir embriones. Antes de que tenga lugar la reproducción, debe haber un mantenimiento y producción efectivo. Una donante gorda es un problema tan grande como una donante flaca. Recomienda vacunar contra agentes virales y bacteriológicos, como así también contra gusanos, por lo menos un mes antes de la superovulación. La provisión de minerales de libre elección también es una buena idea. Las hembras donantes se separan del resto del hato 30 días antes del flushing para centrarse en niveles de energía y suplementación especial de minerales. Luego de que se realiza el flushing, se les otorga un tiempo de descanso de 45-60 días, en donde los niveles de energía disminuyen, para asegurarse de que la vaca no ingrese muy gorda al próximo ciclo de flushing. La vaca potencialmente donante, debe ser reproductivamente sana para producir los mejores resultados. Deberá tener un tracto reproductivo normal en palpación rectal y deberá tener una historia post parto normal, especialmente relacionada con la duración de 18 a 24 días del ciclo del estro (D. Walenciak Hereford, 2005).

1.2.2 Superovulación de la vaca donante.

Las vacas o vaquillonas tratadas adecuadamente, pueden liberar 10 o más óvulos viables en un solo celo. Aproximadamente el 85 % de todas las donantes fértiles responderán al tratamiento de superovulación con un promedio de 5 embriones transferibles. El principio básico de la superovulación es la estimulación del desarrollo folicular a través de una preparación hormonal, que se introduce de manera intramuscular o subcutánea, con actividad hormonal de estimulación folicular (FSH). Se recomienda que un veterinario local palpe las vacas donantes antes del comienzo del FSH, para asegurarse de que tenga un cuerpo luteo activo y de que no haya quistes. El tratamiento de FSH comienza entre ocho y catorce días luego de que se observó el celo. El FSH se aplica dos veces por día durante cuatro días.

El proceso de TE es un trabajo intensivo y requiere instalaciones adecuadas para el manejo del ganado. Las instalaciones son fundamentales, hay un gran manejo de las vacas y es necesario que sea fácil agarrarlas. No es bueno que corran o se estresen durante ese período (D. Walenciak Hereford, 2005).

Las vacas con > 3 mg/ml de progesterona al iniciar el tratamiento superovulatorio, tienen mas cuerpos lúteos (18.7 vs 10.3) total de óvulos y embriones (16.4 vs 8.1) y embriones transferibles (8.3 vs 2.4) que las donadoras con < 3ng/ml de progesterona. Las vacas que tienen una concentración plasmática de progesterona inferior a 3ng/ml al iniciar el tratamiento superovulatorio, presentan una menor respuesta al estímulo superovulatorio. La evaluación de la concentración plasmática de progesterona el día del inicio del tratamiento superovulatorio puede ser utilizado como una herramienta de gran utilidad para seleccionar las mejores donadoras, o bien su aplicación puede ayudar a identificar y excluir a animales que se puedan considerar como donadoras de mala calidad, por supuesto es importante considerar el costo-beneficio y la variabilidad de los resultados (Lòpez. *et al.*, 1999).

1.3 Selección de receptoras.

Las vacas receptoras deben ser seleccionadas en el día 7 del ciclo estral (d 0 = estro). Las vacas deben ser seleccionadas en base a detección de estro (con o sin sincronización) o después de la sincronización de la ovulación sin la detección del estro (Rivera. y Hansen., 2007).

La administración oral de propilenglicol mejora la calidad del cuerpo lúteo y los niveles séricos de progesterona, también permite seleccionar una mayor proporción de receptoras para la transferencia y aumenta los índices de gestación y parto, por lo que su empleo puede mejorar el beneficio económico en el campo y en la industria de la transferencia de embriones (Ordoñez. *et al.*, 2007).

La receptora ideal es la siguiente:

1. Cruzada; preferible cruce de lechero con cárnico (*Bos taurus*).
2. Vaca de talla mediana a grande o vaquilla con buen desarrollo.
3. Vaca que ya haya parido una vez es la más adecuada.
4. Saludable.
5. Libre de tuberculosis, brucelosis y leptospirosis.
6. Que no sea repetidora.
7. Que no esté cebada (condición corporal ideal de 3-4 (escala de 1-5)).

1.3.1 Manejo de vacas receptoras.

El manejo de las hembras receptoras hace al éxito o fracaso de la transferencia embrionaria (TE). Se recomienda seleccionar como receptoras a las hembras que tengan buenas ubres, grandes pelvis y de buen carácter. "También es necesario que las receptoras tengan un buen plan nutricional. Su dieta debe tener entre dos y tres libras de proteína total, dependiendo de los requerimientos de tamaño y lactancia. No se debe subestimar la nutrición adecuada de los animales que se encuentran en el programa de transferencia embrionaria (D. Walenciak Hereford, 2005).

1.3.2 Preparación de las vacas para la transferencia.

- a) Inmovilice la vaca en la trampa (chute).
- b) Las vacas receptoras se Palpan (o utilizar ultrasonido) para identificar presencia de cuerpo lúteo (CL), si no hay presencia de CL, no utilizar esa receptora.
- c) Se marca con tiza, crayón o marcador del lado que el CL está presente.
- d) Afeitar el área de anestesia.
- e) Preparar zona de anestesia epidural limpiando con benzol o yodo tallar con alcohol (etanol al 70%).

- f) aplicar anestesia epidural inyectando 5 ml de lidocaína en el espacio epidural. Cuando se relaja la cola, la receptora está lista para transferirle el embrión.

1.3.3 Nutrición e intervalo de postparto.

Dos factores de manejo que determinan el éxito o fracaso de un programa de sincronización del celo son la nutrición y el intervalo de postparto. La iniciación de los ciclos estrales después del parto se demora si la vaca pierde peso durante la preñez. Cuando las vacas son alimentadas adecuadamente durante la preñez, pero no ganan peso en el periodo parto-servicio, presentaran celo, pero tendrán tasas reducidas de concepción y de preñez en caso de recibir un embrión viable por transferencia. Por lo tanto, es importante evaluar el estado nutricional de las receptoras antes de incorporarlas a un programa de transferencia de embriones. Para ser incorporadas a un programa de sincronización, las vacas deben tener al menos 50 días de paridas, o mas de 50 días si se trata de vacas de primera parición. Como la pubertad es principalmente una función del peso corporal, las novillas deberían haber alcanzado los dos tercios de su peso adulto esperado a los 14 meses de edad. Tanto las novillas vírgenes como las vacas, deben haber presentado tres ciclos normales. Todas las receptoras deben ser examinadas antes de la sincronización, para constatar la normalidad del tracto reproductivo. Otro aspecto importante de la nutrición esta constituido por el fósforo y los minerales traza (Galina. y Valencia., 2006).

1.3.4 Sincronización de receptoras.

Para sincronizar receptoras es: aplicando una inyección de GnRH (100, microgramos IM) seguido a los siete días por una inyección de PGF2 " (25 mg/ml) seguido por la detección del estro. Las vacas detectadas en estro (la mayoría dentro de 48-96 h después de PGF) se programan para recibir un embrión el día 7 del ciclo estral. La transferencia sin la detección de estro puede también ser

realizada usando el programa Ovysynch usado típicamente para la inseminación artificial sincronizada. Este procedimiento de sincronización de transferencia de embriones (TE), todavía está en desarrollo, puede ser útil cuando la detección del estro es difícil por ejemplo durante el estrés calórico.

Las vacas usadas para TE, recibirán una inyección intramuscular de 100 de microgramos de GnRH (Cystorelin) el día 0 seguido por 25 mg de PGF₂ " el día 7 y 100 microgramos de GnRH el día 9. Los embriones se transfieren 8 días después de la inyección de GnRH (Rivera. y Hansen., 2007).

Las receptoras pueden ser seleccionadas mediante un programa de detección del celo o del celo inducido cuando se utilizan tratamientos de sincronización. Las receptoras sincronizadas con PGF deben ser tratadas entre 12 y 24 horas antes que las donantes, por que el celo inducido por la PGF ocurrirá a las 60-70 horas en las receptoras, pero entre 36-48 horas después de la PGF en las donantes superovuladas. Las tasas preñez no parecen ser diferentes entre receptoras con celo natural y receptoras con celo inducido con PGF. Si se decide utilizar PGF, el tratamiento mas usual es el de dosis de PGF con 11 a 14 días de intervalo y detección por 5-7 días después de la segunda aplicación de PGF, cuando se trabaja con novillonas o vacas secas (Galina. y Valencia., 2006).

1.4 Superovulación.

Desde hace años se emplean en el país, métodos para concentrar el celo en vacas y vaquillonas a fin de acortar el periodo de detección de celo e inseminación artificial. Controlado el aspecto sanitario y atendido los requerimientos de la nutrición, es posible aumentar de forma significativa y eficiente la producción de carne /leche con la incorporación de material genético con mayor potencial de producción a través de la IA. La utilización de prostaglandinas (como agente luteolítico), es la más frecuente, por su efectividad, bajo costo y facilidad de uso. (López., 2005).

Se usa en general en vaquillonas y vacas sin cría al pie, con algunas variantes como por ejemplo:

- Inyección I de Prostaglandina:
- Detección de celos e inseminación por cinco días.
- Inyección II de Prostaglandina en la mañana del 6º día.
- Detección de celos e inseminación de acuerdo al estro inducido en los próximos cinco días.

Se ha demostrado que la monitorización del folículo dominante y el control del inicio de su atresia o la inducción de su rotura en el momento de comenzar el tratamiento superovulatorio, puede permitir un incremento importante en el número de embriones transferibles obtenidos y, aunque no da lugar a una disminución en la variabilidad de los resultados, si permite que un mayor número de animales tengan un mayor número de ovulaciones (Quintela. *et al.*, 1999).

La técnica de la superovulación consiste en administrar durante el crecimiento folicular hormonas que provoquen el desarrollo de más folículos, no solamente de uno como normalmente sucede, el ciclo sexual de la vaca dura 21 días (variando de 21 a 23) y se inicia el primer día del predominio de los estrógenos en sangre y un folículo maduro en el ovario (etapa del estro que dura aproximadamente un día), después viene la ovulación y formación del cuerpo hemorrágico con caída de los niveles de estrógenos (etapa del metaestro con una duración de cinco días), continúa el predominio del cuerpo lúteo y reposo sexual por la influencia de la progesterona (etapa del diestro que dura 11 días), y finalmente la regresión del cuerpo lúteo e inicio del desarrollo del nuevo folículo de otro ciclo (etapa del proestro que dura cuatro días), (Rodríguez. y Fernández., 2001).

Uno de los factores que limitan a la técnica de un programa de ovulación múltiple de transferencia de embriones (OMTE) es la gran variación en la respuesta que sigue el tratamiento superovulatorio.

La especie, raza, edad, y el tipo de dosis de gonadotropinas que se manejen son algunos de los factores que influyen sobre la respuesta superovulatoria (López. et al., 1999).

El objetivo principal de los tratamientos de superovulación en vacas es producir un gran número de ovulaciones y obtener la máxima cantidad de embriones transferibles, que den como resultado una alta probabilidad de preñez. La respuesta superovulatoria y la producción de embriones viables de una vaca donante, son resultados de un gran número de factores, entre ellos los relacionados con el tratamiento superovulador, factores individuales y ligados al ambiente. La superovulación se comienza con tratamientos de gonadotropinas entre los días 8 y 10 después que se observa el celo, aproximadamente cuando comienza la segunda onda de crecimiento folicular.(Galina. y Valencia., 2006).

Las gonadotropinas más utilizadas son extractos de pituitarias porcina u ovina o gonadotropina coriónica equina (eCG). Estos extractos contienen altas cantidades de FSH y cantidades variables de LH. La vida media de la FSH es de 5 h y por lo tanto se debe administrar cada 12 h por vía intramuscular (IM). Los tratamientos consisten en dosis decrecientes o constantes durante 4 o 5 días, y se prefieren los extractos con bajo contenido de LH por que producen embriones de baja calidad. La eCG es una glicoproteína compleja con actividad de FSH y LH. Tiene una vida media aproximada de 40 h en la vaca y persiste más de 10 días en la circulación sanguínea. Por esta razón, se administra en una sola dosis IM, seguida por antisuero anti-eCG o anticuerpos monoclonales anti-eCG en el momento de la primera inseminación. Además de la administración de la gonadotropinas, la donante recibe una dosis luteolítica de PGF a las 48 h de comenzado el tratamiento superovulador, y regularmente presenta celo a las 36-48 h pos PGF.

1.4.1 Importancia clínica antes de comenzar un programa de superovulación.

El examen clínico del aparato reproductor es factor clave. La aplicación correcta de los métodos de biotecnología (sincronización de celo, IA, superovulación de transferencia embrionaria, tratamiento de anestro post-parto), dependen del conocimiento y actualización en fisiología reproductiva y farmacología de los agentes terapéuticos. Hay dos factores claves que afectan la respuesta superovulatoria. La disponibilidad de un adecuado número de folículos antrales sensibles al estímulo gonadotrófico, presentes de en el momento de administrar el tratamiento; y la ausencia de un folículo dominante. Depende de la dinámica de la población folicular, controlada por factores ováricos y por el sistema neuroendocrino. El otro factor es la calidad y la dosificación de gonadotropinas. Para lograr un alto número de embriones transferibles, la dosis de gonadotropinas debe ajustarse a la edad de la donante. La respuesta superovulatoria también puede ser afectada por situaciones climáticas extremas, que las mismas se presentan en verano o invierno, dependerá de la ubicación geográfica del lugar donde se lleva a cabo la aplicación de la transferencia de embriones (Becaluba., 2007).

1.5 Sincronización de estros.

La sincronización de celos se puede emplear únicamente en vaquillonas o en vacas secas para ser fecundadas mediante IA. Consiste en la eliminación del cuerpo lúteo mediante medios manuales (extracción manual por recto) o su lisis por medios hormonales (prostaglandinas inyectables). La sincronización de celos no se puede aplicar en rodeos con bajos porcentajes de celo diario, ya que su única función es agrupar los celos de las hembras que se encuentran en condiciones de producirlos. Su principal y quizá único uso consiste en emplearla cuando se desea inseminar un hato de vaquillonas y/o vacas secas en buen estado nutritivo y sanitario, con porcentajes elevados de celo diario y que por

razones organizativas, de personal o económicas, no es posible que en el establecimiento permanezcan durante los 2 a 3 meses de servicio el personal y el equipo necesarios para efectuar la misma. En estos casos, se puede realizar la sincronización de celos económicamente, efectuando la IA. y repaso posterior con toros hasta completar el período de servicio, ya que la sincronización no aumenta la fertilidad de los celos ni la efectividad de la I.A (Bavera, 2005).

Es una las herramientas utilizada para modificar la eficiencia de producción. En muchos casos se aplica con el fin de aumentar el % de ternero logrado y en otros como vamos a ver para facilitar la introducción de nueva genética al rodeo a través de la IA, (Lòpez., 2005).

La evolución de los métodos para el control del ciclo estral en la vaca, puede ser ordenado en 5 fases distintas. La primera comprende todas las investigaciones con el sentido de prolongar la fase lútea a través de la administración de progesterona exógena.

Con el tiempo estos métodos pasaron a contar con una asociación de estrógenos y gonadotropinas. La tercer fase esta caracterizada por la utilización de prostaglandinas con el fin de acortar la fase lútea, la cuarta fase seria aquella en la que fueron desarrollados los métodos con la asociación de progestágenos y prostaglandinas. La denominada quinta fase surgió por estudios mas recientes de las ondas foliculares que mostraron que el control del ciclo estral en la vaca requiere la manipulación no solo de la fase lútea sino también del crecimiento folicular (Becaluba., 2006).

Dentro de las ventajas de la sincronización de estros en bovinos podemos citar las siguientes:

- ◆ Concentración de animales en estro en un corto periodo
- ◆ Racionalización de la IA principalmente en vacas de carne.
- ◆ Concentración y reducción del periodo de parición.

- ◆ Manejo de los alimentos disponibles de acuerdo con la época del año y las categorías de animales.
- ◆ Facilitar la formación de test de evaluación zootécnica para posibilitar la compra de individuos con intervalos reducidos entre los nacimientos.
- ◆ Registro de los terneros, facilitando las prácticas de manejo y comercialización.

Uno de los tratamientos más comunes de sincronización de celos es mediante el uso de la prostaglandina (PGF). Una de las desventajas es la falta de efectividad en la inducción de la luteolisis en los primeros 5 ó 6 días y la variabilidad en la distribución de presentación de celo en un periodo hasta de 5 días, debida al estado folicular al momento del tratamiento. Otros métodos para sincronizar la presentación de celos y ellos están referidos a sincronizar el desarrollo de las ondas foliculares. La ablación del folículo dominante es un método confiable para sincronizar el Benzoato de Estradiol (1 mg) 24 horas después de la remoción del progestágeno; b) 100 mg GnRH al inicio y 100 mg GnRH al momento de IA y c) 12.5 mg LH al inicio y 12.5 mg LH al momento de la IA, determinó diferencias en la presentación de celo pero no en los porcentajes de preñez (Huanca, 2001).

1.6 Método adecuado para el manejo de celo.

El celo o estro es el momento culminante del ciclo estral durante el cuál la hembra es sexualmente receptiva. En este momento la hembra presenta un conjunto de signos característicos que denotan su receptividad, este es el único momento del ciclo en que la hembra se mantiene quieta al ser montada. El perfil hormonal que puede llevar a la expresión de celo en la vaca es un alto nivel de estrógeno en sangre y la caída de los niveles de progesterona por lisis del cuerpo lúteo. Estos altos niveles de estrógeno y baja concentración de progesterona son considerados prerequisites para la expresión de celo, pero no son las que en última instancia inducen el comportamiento clásico de celo (Becaluba. y Becaluba., 2006).

Para llevar a cabo una eficiente sincronización en vacas, el productor debe llevar en cuenta ciertas características que los animales presentan al momento del inicio de su ciclo estral, (Becaluba. y Becaluba., 2006). Como son las siguientes:

- 1) La pasividad a la monta es el único indicador de que la vaca se encuentra en celo. Consiste en la inmovilidad de la hembra durante 6 a 8 segundos al ser montada por el toro o otra compañera del grupo
- 2) Durante el periestro las hembras olfatean y lamen los genitales de sus compañeras.
- 3) Se encuentran inquietas, caminan con mayor frecuencia, mugen, se frotan entre ellas, dejan sus crías.
- 4) Descarga de mucus cervical mas evidente en vaquillonas que en vacas.
- 5) Como consecuencia de las montas reiteradas, la zona del anca se encuentra depilada.
- 6) Edematización vulvar por acción estrógena.

1.6.1 Detección de celos.

En sistemas sujetos a inseminación artificial y servicios a corral, una precisa detección de celos es la llave para una eficiente reproducción. Celos no detectados o falsamente detectados resultan en mayor número de inseminaciones, con la consecuencia de perder leche y terneras de reposición, por aumento de los intervalos entre partos (IPP). Una ineficiente detección de celos es una causa principal que contribuye a que los IPP excedan los 365 días, para los rodeos de partos y servicios casi todo el año. Para los rodeos estacionales una correcta detección de celos permite tener una corta y programada temporada de partos y durante el servicio un alto porcentaje de animales (90%) inseminados en los primeros 28 días de comenzado el mismo (Glauber., 2007).

Según Glauber hay que tener en cuenta los tipos de errores que se pueden presentar en manejo de detección de celos en las vacas.

Tres tipos de errores en la detección podrían identificarse, a saber:

- ◆ Errores por diagnóstico, cuando se falla en el diagnóstico de la vaca o vaquillona en celo y se insemina animales que no están en celo. Esto provoca la existencia de índices de no retorno al celo inferiores a 18 días.
- ◆ Errores por omisión: Cuando vacas en celo no son detectadas. Error de omisión es no actuar ante un problema que si bien existe, no fue detectado.
- ◆ Errores de identificación: Cuando se confunde la identidad de las vacas o vaquillonas. Esto puede ser frecuente en rodeos con más de 200 vacas y en los registros también aparecen vacas con no retorno inferiores a 18 días.

1.6.2 Índices de eficiencia en detección de celos.

- % Detección de celos (posibles/ detectados)
- % Celos detectados a los 60 días post-parto.
- % de Celos antes de los 60 días luego de paridas.
- % de Eficiencia de Detección: %vacas inseminadas /total de vacas en servicio (en un periodo determinado de 21 o 28 días de duración).

1.7 Conservación de embriones.

La posibilidad de conservación de embriones permite la difusión de material de alto valor genético. Para un transporte a corta distancia, la refrigeración a 4°C permite su conservación por 24 horas, en medio de cultivo. El calentamiento de embriones se realiza a 0.6°C por minuto o bien se colocan directamente a 37°C. (Gibbons. y Cueto., 1995).

Los embriones pueden ser conservados, *in vitro*, para su posterior transferencia mediante: Cultivo a temperatura ambiente, refrigeración entre 0 °C a + 4 °C ó

congelación a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Un paso indispensable en la transferencia de embriones es la conservación temporal de embriones recobrados de una donadora antes de ser transferidos o congelados, ésta se realiza en un medio de Solución Buffer Fosfato (PBS), suplementado con 10% suero, 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 (Celestinos. y Gatica., 2002).

En la actualidad, la congelación convencional constituye la única metodología utilizable en programas de criopreservación de rutina, principalmente en aquellos que involucran la conservación de embriones producidos in vivo. Esto podría deberse a que la misma ofrece resultados aceptables y repetibles en gestación y nacimientos (kaiser *et al.*, 2006).

1.7.1 Crioprotectores.

Los embriones, al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formación de cristales que lesionan las estructuras citoplasmáticas. Esta deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación (Celestinos. y Gatica., 2002)

El uso de crioprotectores es fundamental para la supervivencia del *conceptus* que se desea criopreservar. Se utilizan crioprotectores permeables como el dimetilsulfóxido (DMSO) o el propanediol (PROH), y no permeables como la sacarosa.

Los crioprotectores permeables disminuyen el punto de congelación intracelular y los no permeables favorecen la deshidratación por efecto osmótico (Ellen Marelló *et al.*, 1996).

Los crioprotectores debido que tienen un peso molecular bajo, son capaces de atravesar la membrana plasmática de forma activa o pasiva, entre ellos se

encuentran los alcoholes como glicerol, el etilenglicol, propilenglicol o el sorbitol. Los crioprotectores no permeables no son capaces de atravesar la membrana plasmática debido a su elevado peso molecular y a su compleja estructura.

Su principal función es elevar la presión osmótica, disminuyendo la cantidad requerida de crioprotector permeable y su toxicidad, y favoreciendo así la deshidratación de la célula (Monje., 2005).

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. Los periodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas.

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (Portillo. *et al.*, 2006).

1.7.2 Vitrificación de embriones.

La vitrificación es un método de criopreservación extremadamente rápido, en el cual los embriones son incluidos en soluciones altamente concentradas de crioprotectores y sumergidos directamente en el nitrógeno líquido, desde una temperatura superior a los 0°C, demorándose así sólo unos segundos en congelarse.

La vitrificación ha sido utilizada exitosamente como método de congelación de ovocitos y embriones de diversas especies (Silva. y Berland., 2004).

La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones. La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar

al vidrio, tomando de ahí su nombre. Esta técnica permite transferir embriones congelados a campo sin necesidad de equipos y laboratorios muy costosos, obteniendo tasas de preñez que oscilan entre el 30 y el 50 % (Celestinos. y Gatica., 2002).

La consecuencia negativa de esta estrategia radica en el incremento de las probabilidades de lesionar las células debido al choque osmótico y a la toxicidad de los crioprotectores. Sin embargo, se han aplicado protocolos para intentar disminuir esos efectos negativos. Como el uso de crioprotectores menos tóxicos o la combinación de crioprotectores (disminuyendo la toxicidad individual de cada uno, pero manteniendo las propiedades osmóticas y crioprotectoras), la utilización de crioprotectores por etapas o la utilización de soluciones concentradas preenfriadas (Monje., 2005).

1.7.3 Congelación de embriones.

Los embriones congelados en una solución salina tamponada fosfato (PBS) suplementada con proteínas o macromoléculas (suero bovino, albúmina bovina [BSA]), a la cual se le adiciona sustancias denominadas crioprotectoras, que modifican el comportamiento físico de la solución y protegen a las células de los daños asociados al descenso térmico. Uno de los efectos de la cristalización en las soluciones acuosas es remover agua de la solución, ya que los cristales que se forman están compuestos por agua pura, por lo cual la solución remanente, que permanece sobre enfriada, se concentra.

Este proceso se repite hasta que a una determinada temperatura, denominada eutéctica o "punto eutéctico". La fase líquida remanente y los solutos solidifican la congelación convencional principalmente en aquellos que involucran la conservación de embriones producidos in vivo. Esto podría deberse a que la misma ofrece resultados aceptables y repetibles en gestación y nacimientos, observándose sólo una diferencia del orden del 10% entre los transferidos en fresco y los criopreservados (kaiser *et al.*, 2006).

El empleo de embriones congelados posibilita utilizar eficientemente donantes y receptoras; incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie; transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia; controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de ellas, y crear bancos de embriones de valor pecuario (Celestinos. y Gatica., 2002).

1.8 Descongelación de embriones.

El descongelamiento de embriones se realiza en agua a 37C° durante 30 segundos. Posteriormente, se realiza la extracción progresiva del crioprotector en etapas sucesivas (5 a 10 minutos cada uno), sumergiendo los embriones en placas con concentraciones decrecientes de etilenglicol (1 M, 0.5 M), y luego se pasan en una placa con PBS. Otra técnica de remoción del crioprotector del descongelamiento, (Gibbons. y Cueto., 1995).

Las condiciones de descongelación son fundamentales para la supervivencia de los embriones criopreservados. El proceso de descongelación y retiro del crioprotector se logra bajando las diluciones de propanediol (PROH) gradualmente en presencia de sacarosa. La sacarosa mantiene el gradiente osmótico extracelular que previene la entrada de agua excesiva durante el retiro del crioprotector. Cuando el crioprotector ha salido completamente, el embrión se coloca en el medio de cultivo y el agua retorna dentro de la célula (Ellen Marelló *et al.*, 1996)

1.9 Aspiración folicular transvaginal.

La aspiración folicular transvaginal, Ovum Pick-Up (OPU), es una técnica mediante la cual los **ovocitos** inmaduros son recolectados de los folículos en los ovarios de una vaca viva por aspiración guiada mediante ultrasonografía a través de la pared vaginal. Y aparece como una solución de nuevos intentos previos de aspiración de folículos en vacas vivas mediante técnicas como laparotomía y laparoscopia. Para llevar a cabo esta técnica de aspiración folicular *in vivo* se requiere contar con un equipo de ultrasonografía, un transductor sectorial, una bomba de aspiración y un sistema de guía de la aguja. La aguja está conectada a la bomba de vacío por medio de una tubería plástica o de silicona, lo que permite que el contenido folicular sea vaciado directamente al filtro, que es similar al utilizado para la recolección de embriones.

Una vez ubicado el folículo a aspirar, se impulsa la aguja suavemente para que penetre la pared vaginal y luego la folicular; una vez logrado esto la bomba de vacío aspira el contenido y lo deposita en el filtro de embriones o en el recipiente destinado para tal fin. En cualquiera de los casos estos debe contener medio de aspiración heparinizado (PBS+10% de suero fetal bovino). Posterior a esto los ovocitos son procesados igual que para fertilización *in Vitro* (Trujillo. y Fonseca., 2005). La OPU permite incrementar de forma significativa, el número de embriones transferibles y de preñeces por vaca al año, dada la posibilidad de reutilizar las vacas donantes de ovocitos a intervalos mucho más cortos en comparación con la técnica de superovulación. La aspiración folicular transvaginal es un procedimiento que permite la recuperación repetida de ovocitos de donantes vivas, siendo una técnica de alta eficiencia y repetitividad, lo que permite al combinarla con la fertilización *in Vitro* superar con creces el número de becerros obtenidos por donante en un periodo fijo de tiempo en comparación con la superovulación.

La aplicación de esta técnica puede, además, incrementar el número de donantes de ovocitos entre las cuales se podrá contar con hembras pre-puberales, lo que permitiría reducir el intervalo generacional y así incrementar el progreso genético.

2. Inseminación.

La inseminación artificial (I.A.) es una técnica por la cual el hombre actúa de intermediario entre el macho y la hembra, llevando el semen hasta la cercanía del óvulo. Con esta técnica ha sido posible el mejoramiento genético en forma rápida y masiva de los rodeos de cría, lo que ha contribuido al aumento de la producción animal. La detección del celo y la inseminación en el momento oportuno es uno de los pasos fundamentales para el éxito de la I.A. La inseminación intracervical es la que aconsejamos por su rapidez, seguridad y ausencia de complicaciones. Por otra parte, evita abortos en caso de preñez por robo en la hembra a inseminar. Se introduce 1 ml de semen diluido, proveniente de pastilla, ampolla o pajuela (paillets), en el segundo anillo del cuello uterino. Para ello se emplea una jeringa de 2 ml que funciona sólo como bomba impelente de aire, que se acopla mediante un intermediario de goma a una pipeta, generalmente de plástico descartable o de vidrio esterilizable, en ambos casos esterilizada, que carga 1 ml de semen diluido (Bavera, 2005a).

El semen de alta calidad es un requerimiento absoluto. Son recomendables cuatro dosis de semen adecuadas siempre que se manejen y depositen correctamente. Muchos criadores prefieren la IA antes que el servicio natural, es muy útil inseminar con dos dosis 12 horas luego del comienzo del celo y luego utilizar una dosis más a las 12 horas. La liberación de varios óvulos de los folículos múltiples del ovario aumenta la necesidad de asegurarse que los espermatozoides alcancen el oviducto de las hembras superovuladas. Se ha tenido éxito cuando se inseminan a las 12,14 y 36 horas posteriores al comienzo del celo (D. Walenciak Hereford, 2005).

La posibilidad de obtener crías de toros de alto valor genético a un bajo precio (costo de la dosis de semen), con la aplicación de una técnica sencilla y sin necesidad de mayores inversiones en infraestructura que las que habitualmente se encuentran en los establecimientos dedicados a la cría han contribuido a la difusión y adopción de la inseminación artificial por parte de los productores. Si bien existen numerosos factores que deben tenerse en cuenta para la implementación de la IA, uno de los más importantes y quizás el menos comentado es la elección de la categoría de animales que van a conformar el futuro rodeo de inseminación (Robson., 2006).

2.1 Inseminación a tiempo fijo.

El desarrollo de programas de control del ciclo estral que posibilitan la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) ha sido uno de los aportes más importantes realizados por la ciencia para la difusión de esta poderosa biotecnología en la especie bovina. La utilización de la IATF ha simplificado marcadamente la IA de vacas con cría al pie, aumentando de esta manera la base inseminable de los hatos. Los protocolos modernos se basan en controlar ajustadamente el momento de la ovulación, de manera de permitir realizar inseminaciones en tiempo prefijados. Es decir, permiten realizar inseminaciones en forma simplificada en períodos muy cortos y consisten en utilizar dispositivos intravaginales liberadores de la hormona progesterona que permanecen colocados en el animal durante 7 a 9 días. La IATF es realizada en forma sistemática a las 48 a 56 hs. posteriores al retiro del dispositivo. Si bien existe cierta flexibilidad en el tiempo de permanencia de los dispositivos (7, 8 o 9 días), una vez retirados se activa "el reloj de la ovulación" y debe ser sumamente respetuoso de los tiempos. Una gran cantidad de trabajos concluye que los beneficios productivos de la aplicación de la IATF rondan en un 18-20% de aumento en los kilos de ternero destetado. Parte de la diferencia es atribuida a la superioridad genética, y otra parte a que los terneros nacen más temprano en la época de parición.

En definitiva, la utilización de estos protocolos llevará a lograr más kilos de carne (Marcantonio., 2007).

La IA en razas lecheras ha permitido lograr un progreso genético considerable, teniendo en cuenta las pruebas de progenie a grandes escalas. La IATF permite la extensión de esta técnica a todas las categorías de vientres: vaquillonas de primer y segundo servicio y vacas secas adultas y con cría al pie. La aplicación correcta permite obtener un alto índice de preñez en vaquillonas y vacas secas (60-65%) y en vacas con cría al pie (50-60%). Si posteriormente se controla el retorno al primer celo y se insemina, los índices de preñez aumentan a 70-75% para el primer grupo y 60-65% para el segundo (Floretti., 2006).

2.1.1 Finalidad de la aplicación de la técnica de OMTE.

La finalidad de la aplicación de esta técnica en los animales tiene fundamentos de orden genético, comercial, sanitario, y de conservación de especies. Permite lograr los siguientes objetivos. (Gibbons. y Cueto., 1995)

- Aumentar el progreso genético en la producción, a través del incremento de la intensidad de selección de las madres destinadas a la producción de machos superiores al disponer de un mayor número de crías por hembra.
- Aumentar la eficiencia de los programas de núcleo de producción de leche, carne o lana. A su vez se puede evaluar información complementaria o de alguna característica de producción en particular (valores de grasa o proteínas de leche).
- Introducir o difundir nuevas razas o genotipos de alto valor productivo. Las características deseables y de alta heredabilidad pueden ser rápidamente multiplicadas.
- Incrementar la tasa de mellizos (gemelos idénticos). Al realizar la partición de embriones se logran individuos genéticamente iguales, siendo entonces

probar la adaptación de genotipos idénticos, en situaciones ambientales o ambientes diferentes.

- Conservar razas o especies. La conservación de material genético (embriones congelados) permite el reaseguro en bancos de genes que de otra manera desaparecerían con la especie.
- Difundir material genético de alto valor comercial con la finalidad de adaptación ambiental de las crías a diferentes sistemas de reproducción y manejo.
- Reducir riesgos en la transmisión de enfermedades, debido a que los primeros estadios de su desarrollo de embriones presentan una protección natural contra los gérmenes infecciosos.

2.1.2 Grado de clasificación de embriones.

Grado 1.- excelente, embrión ideal, esférico, simétrico. Con células de tamaño. Olor y textura uniforme. Los blastómeros son claramente visibles y la zona pelúcida está intacta.

Grado 2.- bueno, hay algunas imperfecciones triviales, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y posee una gran cantidad de vesículas. Su forma puede ser irregular.

Grado 3.- regular, el embrión posee defectos definidos: detritus celular, forma irregular, olor muy oscuro o muy claro. Pocas células degeneradas, vesículas y presencia de blastómeros desprendidos.

Grado 4.- malo, el embrión posee severos defectos, sería ruptura de la zona pelúcida, el embrión puede estar parcialmente fuera de la misma, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración con granulación y vacuolización de los blastómeros. No se recomienda transferirla.

2.2 Obtención o colección de embriones.

Después de la ovulación, los ovarios liberados son fertilizados (durante la IA) a nivel de la ampolla del oviducto y se convierten en embriones, los cuales 80-90% de ellos descienden del útero a cabo de los 5-7 días después del estro. Los embriones se pueden obtener de los oviductos (4 días después de la inseminación) o del útero (5 días después de la inseminación) o en la exposición del cuerno uterino (a los 6 días post-IA) mediante el sacrificio del animal, también se les puede extraer por la vía quirúrgica o no de esta forma, en un animal intacto a través del proceso conocido como lavado uterino. Los embriones uterinos son los que se recolectan más a menudo por que sus índices de preñez son de los más altos y se les puede congelar con mayor éxito que a embriones más jóvenes en algunas especies. En general pueden recuperarse 40 a 80% de los óvulos que presentan cuerpos luteos en el animal intacto, pero los índices de recuperación son un poco mayores en vías reproductoras extirpadas, pues es posible que en algunos de los ovocitos no sean captados por la fimbria debido a que están agrandados en el ovario superovulado.

Si se tiene en cuenta que no todos los animales donantes responden al impulso superovulatorio, es necesario realizar la selección previa a los animales convenientes antes de comenzar la colección, por ejemplo, colecciona solo cuando están presentes mas de 4 cuerpos luteos en el ovario y este diagnostico lo realiza por vía rectal, inmediatamente antes de la operación (Varisanga., 1993).

Las técnicas de recolección consisten en el lavado interno de los cuernos uterinos. Siete días después de la IA de la donante, los embriones son recolectados con la ayuda de un catéter que es introducido en el útero por la vagina y el cervix. Los catéteres mas utilizados son los Foley de dos y tres vías. Se pueden utilizar una gran variedad de medios de recolección, pero el mas popular es el Dulbeco's Buffer Salino (PSB), debido a que tiene fosfato como buffer, y su pH cambia en forma mínima al ser expuesto a la atmósfera. Un medio de cultivo de embriones ideal será aquel que se asemeje física y químicamente al medio en que se

encontraban los embriones al momento de ser recolectados. Los ovarios de las donantes deben ser palpados (o examinados por ultrasonografía) para estimar la respuesta superovulatorio. Comenzar con las que tiene mayor respuesta para poder organizar la transferencia de los embriones frescos y el congelado. El medio recolectado es volcado en un filtro especial con una malla de 50 m que permita el paso del medio y no de los embriones. Finalizando el filtrado se lava la malla del filtro con PSB utilizando una jeringa y aguja fina; el fluido es recolectado en una caja de Petri y se procede la búsqueda de los embriones (Galina. y Valencia., 2006).

2.2.1 Método quirúrgico.

Para este método, se incide el animal en la línea media después de haber preparado el animal para una intervención quirúrgica y el empleo de la anestesia general. Se prepara el campo operatorio, se abre la cavidad abdominal en la línea media y se trastocan los cuernos uterinos y varios máximamente fuera de la cavidad abdominal, fijando el útero extraabdominalmente y se revisa el efecto superovulatorio a través del conteo de los cuerpos luteos y folículos grandes cavitarios en cada ovario. Los huevos en el oviducto pueden ser lavados ya sea a partir de la fimbria hacia el útero o de la unión úteroobarica hacia la fimbria, o del útero hacia la base del cuerpo uterino. En la práctica de la transferencia se hace el lavado a partir de los 5-7 días después del estro, ya que los embriones han llegado a los cuernos uterinos. En esta técnica, se introduce el medio lavado en la base del cuerno uterino y se deja fluir hacia la punta donde se recolecta el medio utilizando una jeringa con aguja de punta de roma o un tubo de vidrio pequeño introducido en la luz de la herida de punción en la pared uterina (Varisanga., 1993).

2.2.2 Método no quirúrgico.

Por muchas razones es deseable obtener los huevos con técnicas no quirúrgicas ya que todas las técnicas quirúrgicas pueden conducir a la formación de adherencia y en virtud de que existen menos riesgos para la vida y salud del donador con los métodos no quirúrgicos. Existen dos tipos de catéter para la obtención de los huevos de manera no quirúrgica en bovinos, un sistema de lavado de dos vías y uno de circulación de tres vías, siendo este último sistema, el que reduce al mínimo el tiempo de lavado y el volumen de líquido utilizado al tiempo que favorece la penetración cervical en forma excepcional. Cada cuerno uterino se llena con 30 o 60 ml del medio al cual se le permite fluir dentro del vaso recolector mientras se da un masaje suave al útero por vía rectal. Esto se repite hasta que se han utilizado 300 u 800 del medio y después se introduce el catéter de Foley en el otro cuerno uterino y se repite el proceso. El mismo proceso se utiliza para recolectar huevos en yeguas, excepto que el balón se infla en el cuello y se lavan los dos cuernos en forma simultánea. El procedimiento para un lavado en la vaca es el siguiente: se utiliza un catéter de caucho de Foley con un manguito para introducir aire, la recuperación de embriones se hace del útero. Se introduce un medio fisiológico a través del catéter a fin de lavar el cuerno uterino y se regresa por el catéter a una caja recolectora o un frasco (Varisanga., 1993)

2.3 Sincronía donante-receptora o estadio del embrión y receptora.

La obtención de tasas aceptables de preñez por transferencia de embriones, depende parcialmente de que el celo de la receptora y donantes este dentro de una sincronía aceptable, cuyo rango puede variar si los embriones son frescos o congelados. El estadio del ciclo de la receptora y el porcentaje de preñez también están relacionados con la calidad embrionaria. Se han demostrado que embriones de calidad excelente o buena soportan más el asincronismo que los embriones regulares o malos. También se han reportado que los mayores porcentajes de preñez con embriones regulares o malos en receptoras que entran en celo

después de la donante. Esta relacionado con el hecho de que los embriones de calidad pobre, el desarrollo embrionario retardado es frecuente, por lo que el ambiente uterino proporcionado por un receptora en un estadio mas temprano del ciclo resulta mas propicio para este tipo de embrión (Galina. y Valencia., 2006).

Según Galina y Valencia analizaron datos de transferencia de embriones congelados con etilenglicol 1.5 M en receptoras cruza Cebú. Los índices de preñez que estaban entre los días 7 y 7.5 del ciclo (0+12 h fueron respecto a la donante) no fueron diferentes que las que estaban en los días 6.5 y 8 del ciclo pero fueron mayores que de las receptoras entre los días 5.5; 6 y 8.5 del ciclo. Eso indica que lo ideal con embriones congelados es no tener una sincronía mayor de 24 h. en cambio en embriones frescos se pueden llegar a transferir embriones en receptoras que estén entre los días 5 y 9 del ciclo. Sin embargo hay una disminución de preñez cuando se separa de las 36 h de asincronía en relación con la donante.

3. Preparación de los materiales para la transferencia

Lo que se enumera a continuación se prepara y se transporta al sitio el dia de la transferencia de embriones:

- Laminilla térmica a 39⁰ C (si no hay disponible usar un soporte de plástico, hule de espuma o algún otro material como plataforma para los platos de Petri que contienen medio y embriones, para proteger del cambio de temperatura (superficies frías).
- Papel para cubrir la superficie (necesario en caso de que no exista limpia el área de trabajo).
- Etanol al 70% (limpiar todo el área con etanol antes de comenzar cualquier procedimiento y dejar evaporarse por completo).
- Colocar los embriones en una placa o caja de Petri para cargar las pajillas de transferencia con ello.

- La caja de Petri redonda para transferir embriones del tubo donde fueron transportado (60 x 15 debido al tamaño pequeño).
- Jeringas de tuberculina de 1ml.
- Instrumento para manipular embriones. Muchos están disponibles según lo descrito en la guía para el uso de instrumentos de manipulación de ovocitos y embriones.
- Baño de agua 38.5⁰C (baño maría).
- Puntas para pipeteador (puntas amarillas).
- Pajilla Francesa de 0.25 ml.
- Pipeteador fijo en 70 microlitros.
- Aplicador para transferencia de embriones (21 pulgadas).
- Funda para aplicador de transferencia de embriones (con aberturas oblicuas para reducir la contaminación del útero).
- Camisa sanitaria (manga plástica para cubrir la funda).
- Cubierta estéril adicional para las fundas del aplicador de transferencia de embriones.
- Pipeta Pasteur plástico

3.1 cargar las pajillas con los embriones

- Localizar, contar y evaluar los embriones por su calidad.
- Insertar la extremidad amarilla de 200 microlitros sobre la jeringuilla de 1 ml como se muestra (ver figura 1).
- En una placa de Petri (es decir placa de grid) poner tres microgotas de 70 microlitros de medio como se muestra en la foto (A).
- Poner un blastocisto en la gota media (B).
- Insertar del lado del algodón de una pajilla francesa de 0.25 ml en el extremo ancho de pipeta (C, D).
- Aspirar una gota de medio (E).
- Aspirar aire para crear una columna de 0.5 centímetros (E).

- Aspirar la microgota que contiene el embrión (cerciorarse de que el embrión sea aspirado observando debajo del microscopio (F)).
- aspire aire para crear otra columna de 0.5 centímetros (G).
- Aspirar la gota de medio restante hasta que el tapón de algodón es mojado (H).
- Quitar la pajilla de transferencia de la jeringuilla y colocarla en la laminilla térmica.

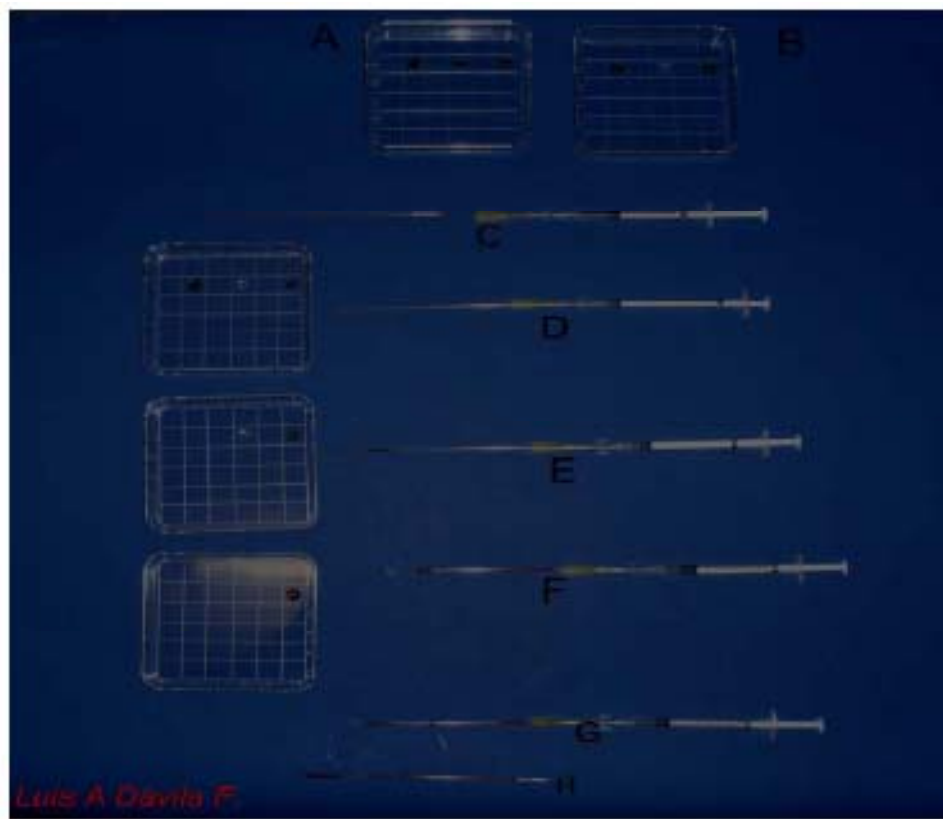


Figura 1. Carga de embriones en la pajilla

3.2 Colocando la pajilla en la pipeta de transferencia (ver figura 2)

- Abrir el paquete que contiene las fundas estériles de transferencia (la funda de uso diseñada para pajilla de 0.25 cc).

- Tirar el émbolo de la parte posterior del aplicador o pistola de transferencia (b).
- Insertar el embrión que contiene la pajilla francesa, por el lado del algodón en el aplicador de transferencia primero (hacer esto sosteniendo la pajilla del lado del tapón del algodón para reducir al mínimo la contaminación de la pajilla a). Si encuentra resistencia inmediatamente cheque si el embolo esta bien hacia afuera (c).
- Mover el anillo hacia el centro del aplicador. Colocar una funda azul sobre el aplicador de transferencia por el extremo abierto. Empujar la funda hasta el final a la parte posterior del aplicador (puedes necesitar aplicar una cierta presión). Mover el anillo azul a la parte posterior del aplicador para sujetar la funda en el lugar (c, d).
- Poner una camisa sanitaria sobre la funda (e).
- Colocar el aplicador cargado en un bolso protector (f).
- Transpórtese al sitio de la transferencia en una posición horizontal.

Dilatador cervical

Quitar el aplicador del bolso protector y mantener el bolso plástico limpio para reutilizar para la transferencia siguiente.

Después de terminar la transferencia, traiga el aplicador de transferencia de nuevo al área de preparación y límpielo con etanol. Hacer esto realizando un solo movimiento de la extremidad del aplicador (el área mas limpia) a la parte posterior del aplicador (el área mas sucia).

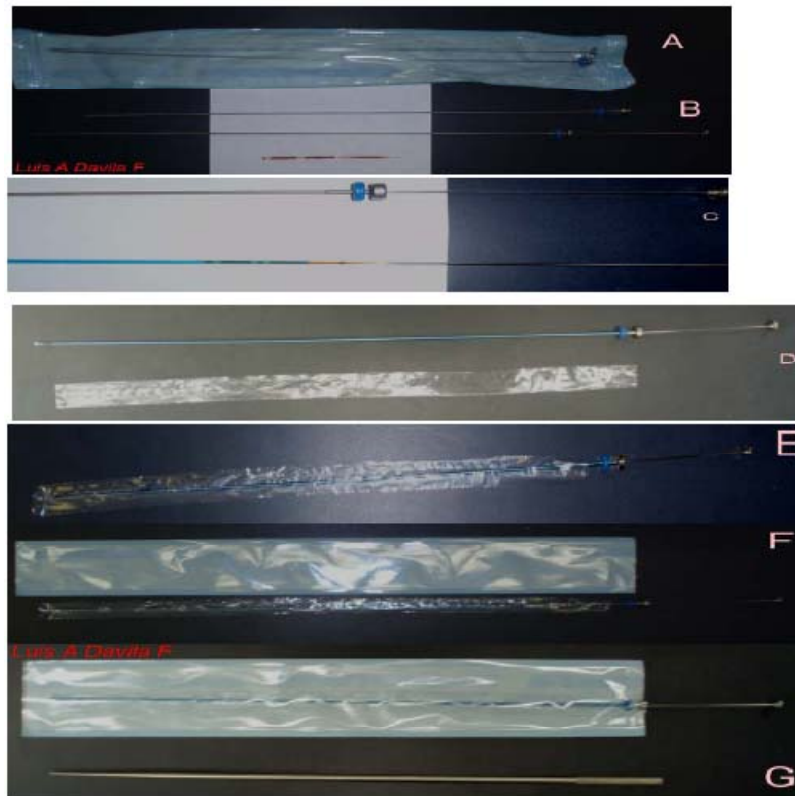


Figura 2. Forma de colocar la pajilla con el embrión con el aplicador

3.3 Procedimiento de la transferencia del embrión

La transferencia se realiza generalmente con la técnica de inseminación artificial.

Se enumeran las modificaciones y las preocupaciones especiales debajo.

- Se debe tener cuidado para evitar la contaminación con heces. Limpiar la vulva a fondo antes de insertar la pipeta de transferencia. Además, los labios vulvares se deben abrir antes de la inserción de la pipeta. Esto se puede lograr por el técnico (empujando el brazo en el recto hacia abajo y detrás levemente) o por un ayudante (haciendo los labios vulvares y tirando hacia afuera).
- La extremidad de la pipeta de transferencia se pone aproximadamente a la mitad del cuerpo uterino ipsilateral al cuerpo lúteo detectado. El embrión entonces se expelle suavemente de la pipeta (Glauber, 2007).

CONCLUSIÓN

El procedimiento de transferencia de embriones en vacas, no es tan complejo como se hace ver, siguiendo a detalle en cada uno de los métodos y llevando un buen manejo reproductivo, podemos llegar a alcanzar un buen porcentaje de efectividad en cuanto a vacas gestantes.

Mas sin embargo, puede existir factores externos como enfermedades u otras anomalías en los animales que afectan directamente a la practica de transferencia de embriones y que son difíciles de contrarrestar, llevándonos así a obtener resultados negativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arévalo., A. R. E. 2007. Implementación de un programa de transferencias de embriones - f1 en bovinos en la zona de la costa, centro y frailesca del estado de Chiapas., Universidad Autónoma de Chiapas. Asociación de Criadores de Razas Puras. SPR. Villa Carriedo de RL., Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Ávila., A. 2007. Transferencia de embriones en ganado bovino., Campo Experimental la "La Posta". Km., 22.5 Carretera. Veracruz-Córdoba., Paso del Toro, Veracruz.

Bavera, G. A. 2005a. Inseminación artificial. Cursos de Producción Bovina de Carne, FAV UNRC.: 1-5.

Bavera, G. A. 2005b. Sincronización de celos. Cursos de producción bovina de carne, FAV UNRC.: 1-3.

Becaluba., F. 2006. Métodos de sincronización de celos en bovinos. p 1-3.

Becaluba., F. 2007. Factores que afectan la superovulación en bovino. Sitio Argentino de Producción Animal.: 1-18.

Becaluba., H. M., y F. Becaluba. 2006. Nuevas tecnologías para el manejo de la detección del celo. Sitio Argentino de Producción Animal.: 1-4.

Celestinos., M., y R. Gatica. 2002. Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. Arch. Med. Vet. 34.: 157-165.

D. Walenciak Hereford, B. A. 2005. Hechos sobre transferencia embrionaria; ya no hay mas limites. 72.: 48-58.

Ellen Marelo, B., M. C. Borrero, B. C. Zuluaga, y B. M. Jiménez. 1996. Primer taller de crioconservación de embriones. , Bogota-Colombia.

Floretti., C. C. 2006. Inseminación artificial una poderosa herramienta subutilizada. Dirección Genética. Estancias y Cabañas Las Lilas S. A.: 51-55.

Galina., C., y J. Valencia. 2006. Reproducción de animales domésticos. 2a. ED.-- México: Limusa, 2006. ED, México.

Gibbons., A. E., y M. I. Cueto. 1995. Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. INTA EEA Bariloche. Centro Regional Patagonia Norte.: 2-32.

Glauber., C. E. 2007. Manejo reproductivo en el rodeo bovino lechero: Propuestas y reflexiones. p 1-5., Buenos Aires, Argentina.

Huanca, W. 2001. Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas lecheras. Rev. Inv. Vet. Peru. 12.: 161-163.

kaiser, G. G., J. F. Aller, N. Mucci, y F. Hozbor. 2006. Criopreservacion de embriones de bovinos. Área de obstetricia, Fac. Cs. Vet. 7: 1-11.

López., D. 2005. Sincronización de celo, sexado de semen, transferencia de embriones: Por que y para que en un sistema de cría. Aspectos claves. Jornada de Actualización Técnica Ganadera Ganadería con precision. Región de Centro de AACREA, CREA Calamuchita.: 1-6.

López., J. R. A., M. E. A. Gamboa., y A. M. A. García. 1999. Concentración plasmática de progesterona y producción embrionaria, en vacas superovuladas bajo condiciones tropicales. Vet. Mex. 30: 19-23.

Marcantonio., S. A. 2007. Inseminación a tiempo fijo. Sitio Argentino de Producción Animal. 1.: 8-13.

Monje., J. L. A. 2005. Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la tecnica de open pulled straw: Estudio estructural de cromosomas, microtubulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro. Tesis Doctoral., UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA FACULTAD DE VETERINARIA., Bellaterra.

Morales, M. D. C. 2005. Factores que determinan la adopción de tecnología en el área de reproducción en el ganado bovino., CEIGEIT. FMVZ-UNAM.

Ordoñez., C. O. H., C. T. Miguel., y N. F. Fernandez. 2007. El propilenglicol mejora los resultados de la transferencia de embriones. 4: 33-37.

Portillo., L. M. À., M. J. I. Madero, MSc., y C. L. Bacter. 2006. Fundamentos de criopreservacion. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologia. 57.: 291-300.

Quintela., L. A., J. J. Becerra., y P. G. Herradòn. 1999. Influencia del dia de inicio del tratamiento en los resultados de superovulacion en vacas lecheras. Arch. Zootec. 48.: 43-50.

Rivera., R. M., y P. J. Hansen. 2007. Preparacion de embriones producidos en vitro para transferir a receptoras., Florida.

Robson., R. C. 2006. Ventajas y desventajas de las distintas categorías que pueden conformar un rodeo de inseminación artificial.: 1-4.

Rodriguez., B. C., y R. C. Fernández. 2001. La transferencia de embriones. Una tecnica de mejoramiento animal en ganado de lidia. Cir. Ciruj. 69.: 129-134.

Silva., M. E., y M. E. Berland. 2004. Vitrificación de blastocitos bovinos producidos in vitro con el método open pulled straw (ops): Primer reporte. . Arch. Med. Vet. 36.: 79-85.

Trujillo., H. N., y H. F. Fonseca. 2005. Aspiración folicular transvaginal. Manual de ganaderia de doble proposito.: 612-614.

Urrego., R. A., A. Pareja., y N. A. Vásquez. 2005. El ensayo cometa: Una tecnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos. Rev. Col. Cienc Pec. 18.: 222-227.

Varisanga., M. D. 1993. Transferencia de embriones en el ganado bovino. Algunos factores que influyen en la respuesta superovulatoria de la donante y la gestación en receptoras. Trabajo de Tesis para la opción de Maestría en Reproducción Animal., INSTITUTO SUPERIORES DE CIENCIAS AGROPECUARIAS DE LA HABANA. "FRUCTOSO RODRIGUEZ PEREZ". La Habana, Cuba.