

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



MONOGRAFÍA:

“TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS”

Presentada por:

CARMONA BOBADILLA DIEGO ARMANDO

Como requisito parcial para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

DICIEMBRE 2013.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



MONOGRAFÍA:

“TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS”

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta

CARMONA BOBADILLA DIEGO ARMANDO

Asesor:

MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

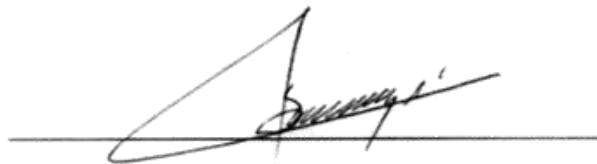
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

MONOGRAFÍA

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

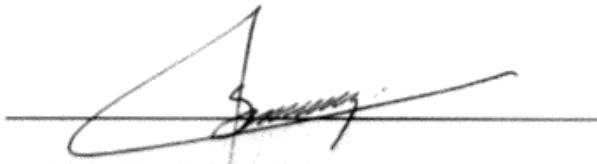
APROBADO POR EL COMITÉ

PRESIDENTE DEL JURADO



MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE
CIENCIA ANIMAL**



M.V.Z. RODRIGO I. SIMON ALONSO



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

DIECIEMBRE 2013

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

MONOGRAFÍA

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

POR:

CARMONA BOBADILLA DIEGO ARMANDO



M.V.Z. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO
PRESIDENTE



MC. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS
VOCAL



M.V.Z. CUAUHTÉMOC FÉLIX ZORRILLA
VOCAL



M.V.Z. SILVESTRE MORENO ÁVALOS
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN. COAHUILA

DIECIEMBRE 2013

Agradecimientos

El presente trabajo primeramente me gustaría agradecerte a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A mi universidad tan querida **UAAAN UL; Alma Terra Mater**. Por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A mi asesor **MVZ. Rodrigo I. Simón Alonso** por su esfuerzo, dedicación, sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación, en la elaboración de este trabajo.

También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, por sus consejos, su enseñanza y más que todo por su amistad.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su cariño, consejos, apoyo, amistad, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida, y por qué no también en los momentos alegres que me han compartido. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Para ellas(os): **Muchas gracias y que Dios los bendiga.**

Dedicatoria

A ti **Dios** mío, por darme la oportunidad de existir, aquí y ahora; por mi vida, que la he vivido junto a ti, dándome fortaleza y humildad para seguir.

A mis padres **Emilia Bobadilla Olivares & Natividad Carmona Gonzales**, gracias a ellos sé que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de dedicación y esfuerzo. De ellos he aprendido que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos son mi razón de seguir adelante. Los quiero MUCHO.

A una persona muy especial en mi vida, aunque ya no está conmigo físicamente, yo sé que en todo momento me ha acompañado, en mis desvelos, en mis momentos más difíciles, por eso a ti **Aldo Augusto Carmona Bobadilla** hermano querido te dedico mi esfuerzo donde te encuentres. Hasta luego, porque algún día nos volveremos a encontrar.

A mis abuelitos **Agustina Olivares & Blas Bobadilla**, gracias a su sabiduría han influido en mi la madurez para lograr los objetivos, por quererme y apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes.

A mis tíos y primos hermanos; **Mire, Sandy, Ivonne, Luis, Alonso y Ricardo**. Por el apoyo incondicional y estar a mi lado en todo momento.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 3. ANTECEDENTES | 3 |
| 4. Fisiología | 4 |
| 4.1. Ciclo estral | 4 |
| 4.2. Crecimiento y Ondas foliculares..... | 5 |
| 5. Selección de donadora | 6 |
| 5.1. Los criterios generales para selección de la donadora | 6 |
| 6. Selección de receptora | 7 |
| 6.1. Criterios a considerar en receptoras | 8 |
| 7. Examen clínico antes de la superovulación | 8 |
| 8. Superovulación | 8 |
| 8.1.1. Variabilidad debida a los tratamientos hormonales | 10 |
| 8.1.2. Gonadotrofina | 10 |
| 8.1.3. Gonadotrofina menopáusica humana (hMG)..... | 11 |
| 8.2. Esquemas de SOV desde la década de los años 90 hasta el presente..... | 13 |
| 8.3.. Esquema Tradicional De la Sov | 14 |
| 8.3.1. Protocolos a tiempo fijo..... | 15 |
| 8.3.2. GnRH..... | 15 |
| 8.3.3. Pre-sincronización de GnRH..... | 16 |
| 8.4. Protocolo de Sov con implantes de progesterona y estradiol | 17 |
| 8.5. Esquema denominado P-36..... | 18 |
| 9. Sincronización de receptoras | 19 |
| 9.1. Prostaglandina F2 α | 19 |
| 10. Factores a considerar en los programas TE | 21 |
| 10.1. Ambiental | 21 |
| 10.2. Manejo..... | 21 |
| 10.3. Nutrición | 21 |
| 10.4. Monta natural/inseminación | 22 |
| 10.5. Edad | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 10.6. Sanidad | 22 |
| 11. Dificultad al momento de la transferencia. | 23 |
| 12. Transferencia quirúrgica | 23 |
| 13. Transferencia no quirúrgica | 24 |
| 14. Anestesia epidural. | 27 |
| 15. Obtención de embriones | 27 |
| 15.1. Instrumentos (Méndez et al., 2006): | 29 |
| 15.2. Fármacos y desinfectantes (Méndez et al., 2006): | 29 |
| 16. Búsqueda y manejo de los embriones. | 29 |
| 17. Desarrollo embrionario. Nomenclatura | 30 |
| 18. Evaluación Embrionaria | 31 |
| 18.1. Embriones transferibles | 32 |
| 18.2. Clasificación de embriones | 33 |
| 19. Conservación de embriones. | 34 |
| 19.1. Refrigeración 0-4°C | 34 |
| 19.2. Método de congelación standard | 35 |
| 19.3. Vitrificación | 36 |
| 20. Descongelación | 36 |
| 21. Clasificación de los crioconservadores | 36 |
| 21.1. Penetrantes. | 36 |
| 21.2. No penetrantes. | 37 |
| 22. Técnica TE | 37 |
| 23. Procedimiento | 38 |
| 24. Conclusiones | 40 |
| Bibliografía | 41 |

Lista De Figuras Y Cuadros

| | |
|---|----|
| Figura 1. Sincronización de receptoras (Ovsynch) | 20 |
| Figura 2. Esquema de circuito cerrado con flujo continuo..... | 25 |
| Figura 3. Esquema de circuito abierto con flujo discontinuo. Inyección y recolección con jeringa | 26 |
| Figura 4. Catéter flexible..... | 27 |
| Figura 5. Catéter insuflable | 28 |
| Cuadro 1. Composición del medio para colección y mantenimiento de embriones. | 28 |
| Cuadro 2. Criterio de clasificación para embriones bovinos | 31 |
| Figura 6. Etapas de embrion | 33 |
| Figura7. Pajuela para embriones | 39 |
| Figura8. Pistola para depositar los embriones..... | 39 |

1. RESUMEN

Los programas de transferencia de embriones (TE), son utilizados como una herramienta para acelerar el mejoramiento genético. Sin embargo, las respuestas en la obtención de embriones en donadoras, así como la tasa de gestación en receptoras son variables. Con la tecnología existente, un promedio de 8 a 12 óvulos o embriones será recogido de cada vaca donante por medio de la superovulación y serán transferidos embriones de 5 a 8, resultando en vacas gestantes de 3 a 6. Hay que destacar que muy pocas hembras donadoras son promedio. Las tasas de gestación son generalmente alrededor de 60% con embriones frescos y van desde un 50% a 60% con embriones congelados. Uno puede anticipar una pérdida la muerte de 10% en el diagnóstico de gestación.

El objetivo de la transferencia de embriones es obtener a partir de progenitores de alto mérito genético, el mayor número posible de descendientes utilizando el útero de receptoras de menor valor económico para llevar la gestación a término.

Para lograr dicho objetivo es necesario, en primera instancia, contar con un número elevado de embriones transferibles. A tal fin, debe provocarse en la hembra donante una estimulación ovárica adecuada mediante la administración de gonadotrofinas.

El ciclo estral del ganado ha sido frecuentemente modificado mediante tratamientos hormonales para tratar de inducir la sincronía del celo en grupos de animales durante un período determinado. La sincronización de estros ayuda a mejorar la eficiencia reproductiva al implementar adecuadamente técnicas como la inseminación artificial (IA) o TE. La falta de detección de celos, fallas en ovulación, presencia de folículos chicos, asincronía en el estro y presencia de cuerpo lúteo, son algunos de los factores que pueden influir en la exclusión de vacas de programas reproductivos.

Palabras clave: donadora, receptora, superovulación, sincronización, crioconservación.

2. INTRODUCCIÓN

La reproducción en animales domésticos ha incrementado su desarrollo gracias a la manipulación de biotecnologías en las cuales abarcan la inseminación artificial, la congelación de semen, la micromanipulación, la producción in vitro, el clonado y la congelación de los embriones (León,2006). En la actualidad se ha estudiado el mecanismo de acción de las hormonas de la reproducción en el ganado bovino, las cuales nos han permitido crear diferentes protocolos hormonales tanto para sincronizar como para superovular a las hembras bovinas. (Córdova, 2011).Tiene como objetivo incrementar la tasa reproductiva de las hembras de alto valor genético. La transferencia de embriones consiste en inducir un embrión en etapa de preimplantación en el útero de la hembra denominada receptora, la cual se encargara de gestarlo y llevarlo al nacimiento. El embrión transferido puede ser fresco o congelado (León, 2006).

Los esquemas utilizados podrían tener efectos colaterales asociados de manera directa o indirecta con el uso incontrolado de hormonas exógenas, o con el tiempo durante el cual las donadoras o receptoras son sometidas a los tratamientos, olvidando aspectos fundamentales de la ética en la experimentación animal. La proliferación de esquemas de SOV, busca mejorar las tasas de respuesta en la producción de embriones de calidad y aumentar las tasas de gestación de los embriones transferidos(Maldonado *et al.*, 2008).En el cual se consideran la diferencia que hay entre protocolos tradicionales y los protocolos que hoy en día se denominan como de tiempo fijo. Los protocolos tradicionales trabajan de acuerdo con la fisiología del ciclo estral y se busca iniciar el tratamiento al inicio de una onda folicular, el tratamiento SOV se debe iniciar entre los días 8 y 11 del ciclo estral. Efectuarse entonces la obtención de embriones(Jiménez, 2009).El uso de la criopreservación de embriones en el proceso de TE, brinda una herramienta de utilidad, a través de esta técnica podemos conservar durante un prolongado período de tiempo un embrión de excelente calidad, que permite utilizarlo cuando y donde se produzcan las condiciones favorables para lograr la preñez de las receptoras, o ser usada en algún otro lugar (Belascoain, 2010).

3. ANTECEDENTES

La transferencia de embriones tiene su origen en los años cincuenta, pero solo hasta los setenta se consideró como una alternativa comercial. A pesar de llevar más de 40 años, las tasas de superovulación y de preñez no se han mejorado sustancialmente (Jiménez, 2009). En los últimos 30 años la aplicación de esta tecnología ha ido en aumento (especialmente en el ganado lechero), con más animales seleccionados por su genética que por un fenotipo deseable. En el mundo, más de 121.000 donantes son superovuladas y más de 670.000 embriones transferidos según IETS 2003. La mayoría de los embriones transferidos en el 2006, fueron congelados (53 vs. 47%), con algunas notables diferencias dependiendo de la región (Colazo & Mapletoft, 2007). La comercialización de tecnología para la transferencia embrionaria comenzó en América del Norte. Una hembra (donadora) puede aumentar su número de crías durante su vida al concebir de manera repetida y mediante la recuperación de embriones al inicio de la gestación y la transferencia de estos a los aparatos reproductores de otras hembras (receptoras) para completar la gestación. Este procedimiento depende por completo de la disponibilidad de una fuente de embriones de calidad adecuada y el medio uterino propicio de la receptora al momento de la transferencia embrionaria (sincronía) (León, 2006).

La transferencia embrionaria se ha aplicado muy extensamente en la vaca, en consecuencia, la tecnología ha avanzado con más rapidez en esta especie. En los años 60, la anestesia general y la laparotomía eran necesarias para la colección y TE bovinos, y en el Reino Unido y América del Norte esta técnica se utilizó sobre todo para la rápida multiplicación razas exóticas de carne (León, 2006).

La utilización de embriones junto a la IA en los programas de mejora genética es una práctica que ha venido difundándose en forma creciente en los últimos 20 años. Sin embargo, esta tecnología que tiene un enorme potencial de mejora genética, no ha tenido la difusión masiva que debiera en función de tal potencialidad. Las limitantes han sido tanto los altos costos de la misma, como la

enorme variabilidad en la respuesta de los animales destinados a producir tales embriones. Lo anterior parece marcar límites económicos y biológicos en la tecnología que no han podido ser superados en los últimos 20 años y que limitan su desarrollo (León, 2006).

4. Fisiología

En los últimos 20 años, se logró una mejor comprensión de la fisiología reproductiva en el ganado vacuno, particularmente relacionado a la función ovárica, debido al uso de la ecografía y el desarrollo de ensayos hormonales más exactos (Sartori & Barros, 2011).

4.1. Ciclo estral

El ciclo estral de la vaca suele ser independiente de la estación del año. El estro o celo se observa cada 21 días en promedio, con un rango de 18-24 días. El día del estro se considera como el día 0. Dura relativamente poco, 18 horas de promedio, con un rango de 4-24 horas. La ovulación se da unas 30 horas después del inicio del estro, es decir, después del final del estrocomportamental. La fertilización del óvulo se da en el oviducto. El blastocito llega al útero alrededor del día 5. La gestación dura 279-290 días. El intervalo entre el parto y la primera ovulación varía enormemente dependiendo de la raza de la vaca, su nutrición, rendimiento lechero, estación y la presencia de un ternero mamando (Ptaszynska, 2007).

Representa un patrón cíclico de actividad ovárica que permite a las hembras ir de un periodo reproductivo de no receptividad a uno de receptividad permitiendo establecer el apareamiento y el subsecuente establecimiento de la gestación (Fordeet *al.*, 2011).

El inicio del ciclo estral ocurre al momento de la pubertad, en donde la hembra bovina entra a un periodo de ciclicidad reproductiva que continua a través de toda su vida, a excepción del periodo de gestación o de balance energético negativo en el cual prevalece el anestro(Sartori & Barros, 2011).

El crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos es un proceso fundamental para la alta eficiencia reproductiva en los animales. Durante el desarrollo fetal se establece un número fijo de folículos primordiales, el crecimiento del folículo ovárico en un período de 3-4 meses.(Rivadeneira, 2013).

4.2. Crecimiento y Ondas foliculares

El crecimiento y el desarrollo folicular se caracterizan, en los rumiantes, por dos o tres olas foliculares consecutivas por ciclo estral. Una onda de crecimiento folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos (Rivadeneira, 2013). Cada ola implica el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos de la reserva ovárica total y la selección de un folículo dominante, el cual es anovulatorio si ocurre durante la fase luteal y ovulatorio si ocurre en la fase folicular y varios folículos subordinados que invariablemente se atresian. Se puede distinguir tres fases distintas en el desarrollo folicular: reclutamiento, selección y desviación o dominancia(Ptaszynska, 2007). Cada ola se caracteriza por un pico transitorio de la hormona folículo estimulante (FSH), que estimula el crecimiento de alrededor de cinco folículos de diámetro entre 4 y 5 mm; este periodo se conoce como reclutamientocíclico, una etapa de selección, en la cual uno de estos folículos es elegido para continuar creciendo (folículo dominante) y por último, la dominancia que ejerce este folículo sobre el crecimiento de los folículos que comenzaron a crecer con él (folículos subordinados). Todos los folículos que no son seleccionados como dominantes, sufren un proceso degenerativo conocido como atresia folicular mediante el cual son eliminados del ovario(Rosales & Guzmán, 2008).

5. Selección de donadora

Los criterios de selección de animales donadores son diversos y dependen de la razón por la cual se quiere realizar la transferencia de embriones, aunque en general las razones están motivadas por aspectos económicos. El advenimiento de técnicas no quirúrgicas de recolección y transferencia, así como el incremento en las tasas de preñez con la transferencia directa e indirecta de embriones congelados, han contribuido a una forma en la reducción de los costos (Mapletoft, 2013).

La selección debe basarse en tres criterios: superioridad genética, capacidad reproductiva y valor comercial de la progenie, cada ganadero tiene sus propias razones para la selección de sus donantes, las cuales son a menudo más subjetivas que genéticas. Al seleccionar donadoras, se deben considerar características objetivas como la facilidad de parto, producción de leche, peso al destete, al año y valor de la canal, también es muy importante la selección del semen, ya sea por monta natural o IA con el que se preñara a la donadora. (Mapletoft, 2013).

5.1. Los criterios generales para selección de donadora (Ávila, 2013):

1. Estado sanitario (no presentar enfermedades hereditarias).
2. Características genéticas de importancia económica (tener excelente historial reproductivo, productivo y de salud).
3. Ciclos estrales regulares.
4. Sin problemas patológicos, en especial las patologías reproductivas y las asociadas al postparto.
5. Sin enfermedades de transmisión genética.
6. Entre 2 y 5 años de edad, dependiendo de la raza y tipo de explotación (no ser demasiado viejas).

6. Selección de receptora

Las receptoras forman una parte esencial del programa de TE y también uno de los problemas más serios. Las buenas receptoras son caras, su mantenimiento costoso y su estado de salud es crítico para el éxito de la TE. Ya sea que el programa se lleve a cabo en el campo o en un centro, la obtención y mantenimiento de las receptoras condicionarán el éxito o el fracaso del mismo (Albeiro, 2001).

Desde el punto de vista reproductivo una buena receptora es la hembra capaz de recibir un embrión y llevarlo a término (parto). Más aún, la receptora deberá ser capaz de parir sin grandes dificultades y luego alimentar al ternero de manera que le permita expresar su potencial genético. En consecuencia, deberá ser de buen tamaño, tanto general como reproductivamente sana y de buena capacidad lechera. El tamaño de la receptora dependerá del tipo de animal (embrión) que se transferirá. De acuerdo con las tendencias actuales, particularmente en las razas para carne, se busca un gran tamaño de ternero con pesos al nacimiento de 40 - 50 kg y aún más. Por lo tanto, no se deben tener dudas de elegir hembras de gran tamaño (Albeiro, 2001).

Además de una variedad de parámetros que deben ser evaluados, como el factor racial, edad, estado fisiológico, sanidad, peso, integridad del tracto reproductivo y manejo, es de gran importancia hacer un seguimiento de las estructuras ováricas presentes durante la sincronización del estro, así como de las etapas previas y posteriores al transferir el embrión. De este modo, un óptimo desarrollo folicular será determinante para la formación de un cuerpo lúteo (CL) que genere concentraciones plasmáticas de progesterona (P4) suficientes para ofrecer un medio ambiente uterino adecuado y favorecer el óptimo desarrollo embrionario.(Irouléguy, 2011).

Al momento de la transferencia, la receptora ideal es aquella con sincronismo o con un asincronismo de +/- 24 h, en la que se ha comprobado la presencia del CL;

además se debe relacionar el estadio de desarrollo embrionario con el día del ciclo de la receptora (Irouléguy, 2011).

6.1. Criterios a considerar en receptoras (Herrera, 2010). :

1. Si es cruzada, que tenga menos del 75% de razas indicus.
2. Línea lechera, temperamento tranquilo y evidente amplitud pélvica.
4. Que haya parido sin dificultad
5. Joven y libre de enfermedades infectocontagiosas.
7. En franca ganancia diaria de peso.

7. Examen clínico antes de la superovulación

El examen clínico del aparato reproductor es un factor clave. La aplicación correcta de los métodos de biotecnología, sincronización de celo, IA, superovulación, transferencia de embriones, tratamiento de anestro posparto, dependen del conocimiento y la actualización en fisiología reproductiva y farmacológica de los agentes terapéuticos (Becaluba, 2007).

El examen clínico va a determinar el estado reproductivo de la hembra en caso de estar preñada, en puerperio o vacía en sus condiciones de normal o patológica. Como regla solamente receptoras normales son aceptadas en el programa. Las donantes con problemas reproductivos son incorporadas después de haber sido convenientemente tratadas y dadas de alta. Las vacas post parto son incorporadas a programas de superovulación después de haber finalizado su puerperio y reiniciado la actividad ovárica. (Becaluba, 2007).

8. Superovulación

La superovulación (SOV) en la vaca es un paso muy importante en los procesos de transferencia de embriones (TE). La vaca es un animal monotoco, por lo que generalmente libera solo un óvulo en un ciclo estral. El objetivo principal de la SOV

es estimular extensamente el desarrollo folicular en cada ciclo estral. Vacas y novillas que han sido tratadas pueden liberar 10 o más óvulos viables durante un ciclo estral; aproximadamente un 85% de las vacas donadoras fértiles pueden responder a tratamientos de SOV con un promedio de 5 embriones transferibles. Algunas vacas son tratadas repetidamente en un intervalo de 60 días, presentando un decremento en la producción de embriones(Garzón *et al.*, 2007).

El objetivo principal de los tratamientos de superovulación en vacas es producir un gran número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez(Garzón *et al.*, 2007).

Experimentos y pruebas de campo realizados durante la década de los 80 llevaron a la conclusión general que los tratamientos superovulatorios iniciados durante los días 9 ó 10 después de detectarse el celo resultan en una mejor respuesta superovulatoria que aquellos iniciados antes (días 2 a 6) o después (día 12 o 13). Esto es debido a que durante el ciclo estral bovino hay 2 ó 3 ondas de desarrollo folicular y en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza, en promedio, entre los días 9 y 10. No obstante, hay una gran variación individual y la segunda onda puede comenzar más temprano (día 6) o más tarde (día 12) (Garzón *et al.*, 2007).

La SOV y la sincronización no pueden verse como un hecho aislado, sino que éstas se basan en una serie de acontecimientos fisiológicos que abarcan procesos endocrinos desde el ciclo estral hasta la ovulación de los folículos que se han desarrollado en respuesta al tratamiento hormonal suministrado y que son los responsables en gran medida, en términos de embriones recuperados y de su calidad (Bolívar &Mapletoft, 2008).

Diversos factores parecen influir en la respuesta de la donadora al tratamiento SOV, tales como la edad o el número de partos, el ambiente, la dosis de hormona

utilizada, el momento en que se aplica, factores nutricionales, factores inherentes a la receptora, y a cada finca, entre otros (Bolívar & Mapletoft, 2008).

La superovulación seguida de inseminación artificial puede ser usada para obtener embriones de donantes valiosas. Estas técnicas, asociadas con la transferencia de embriones a receptoras, son una poderosa herramienta para diseminar alta calidad genética (Baruselli et al., 2011)

8.1.1. Variabilidad debida a los tratamientos hormonales

8.1.2. Gonadotrofina

La inducción a la superovulación se efectúa principalmente con gonadotrofina sérica de yegua preñada PMSG o con extractos de pituitaria porcina que generalmente se conocen como FSH-p, a pesar de que en muchos casos contienen mayor cantidad de hormona luteinizanteLh que de hormona folículo estimulante (Cabodevila&Torquati, 2001).

La **PMSG**, también denominada gonadotrofina coriónica equina eCG, es una glicoproteína producida por los cálices endometriales y se comprueba biológicamente entre los días 35 y 140 de gestación. La relación FSH/LH de esta hormona varía durante la preñez (Cabodevila&Torquati, 2001).

La PMSG debido a su elevado peso molecular no atraviesa el filtro renal y por lo tanto, tiene larga vida media en sangre (Cabodevila&Torquati, 2001). Persiste en sangre por más de 10 d y altos contenidos de LH, lo que genera una respuesta exagerada en el crecimiento folicular (Jiménez, 2009). Esto permite inducir superovulación en la hembra bovina mediante la administración de una dosis única entre los días 8 y 14 del ciclo estral. Sin embargo, su permanencia prolongada en sangre provoca un crecimiento folicular disperso, con niveles altos de estrógenos que afectan tanto la tasa de fertilización como la calidad

embrionaria. Además de generar procesos inmunitarios que hacen necesario, en tratamientos posteriores, emplear una mayor dosis de hormona para lograr el mismo efecto (Cabodevila&Torquati, 2001). La utilización de un suero anti PMSG para eliminar los efectos indeseables de esta hormona, luego de inducida la superovulación. Distintas especies han sido empleadas para obtener este suero: pavos, cabras, bovinos (Cabodevila&Torquati, 2001).

La recomendación para la eCG es la utilización de 2000-2500 UI el día 9-11 pos-celo con aplicación de prostaglandina (PG) 48-60 h después y 5 ml anti-eCG IV con la primera inseminación (Jiménez, 2009). El momento más oportuno para administrar el suero anti-PMSG es luego de producido el pico preovulatorio de LH. En la práctica, en el momento de la primera o segunda IA, debido a que el suero anti- PMSG reaccionar en forma cruzada con las gonadotrofinas hipofisarias y puede interferir con el pico preovulatorio de LH(Cabodevila&Torquati, 2001). El estro es igual al de FSH. Dosis excesivas de eCG frecuentemente produce quistes foliculares(Garzón *et al.*, 2007).

La FSH-p es la gonadotrofina más empleada en el pasado y el presente de la superovulación de hembras bovinas. El tratamiento de superovulación con esta hormona se basa en la administración de dos dosis diarias durante 4 ó 5 días, comenzando en general entre los días 9 y 13 del ciclo estral se emplean también el día 14 del ciclo(Cabodevila&Torquati, 2001).

8.1.3. Gonadotrofina menopáusica humana (hMG)

Es utiliza principalmente en humanos y actualmente poco en veterinaria por su alto costo. Esta hormona tiene la misma cantidad de FSH que de LH y los tratamientos consisten en aplicaciones intramuscular cada 12 h en dosis decrecientes por 4 a 5 días (Jiménez, 2009).

La HMG es un preparado altamente purificado de vida media muy corta. Los resultados de superovulación con esta hormona son comparables con los de la PMSG y con los de la FSHp observaron con la HMG un porcentaje de preñez menor luego de la transferencia no quirúrgica de los embriones con respecto al obtenido con la FSH-p(Cabodevila&Torquati, 2001).

La hormona folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH), las cuales, influyen directamente sobre las gónadas y producen de manera secuencial el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos, la secreción de estrógenos, la ovulación, el desarrollo del cuerpo lúteo y la secreción de la progesterona. La FSH es la promotora del crecimiento y desarrollo folicular y la LH es por su acción la que junto con la FSH contribuye a la maduración del folículo y además es productora de la ovulación. La secreción y el control de la secreción de las gonadotropinas FSH y LH están bajo la modulación de los esteroides ováricos. FSH. La hormona folículo estimulante (FSH) es una glicoproteína sintetizada por la células basófilas de la hipófisis anterior y su vida media en la sangre de los bovinos es aproximadamente de 5 h. Un pico de FSH en el plasma coincide con la descarga Preovulatoria de LH al inicio del celo, con uno más discreto aproximadamente 24 horas más tarde. A lo largo del ciclo estral se producen picos adicionales al parecer relacionados con las ondas de crecimiento folicular. En la vaca se ha descrito secreción pulsátil de esta hormona. Recientes reportes sugieren que la FSH puede tener un papel luteotrópico(Rosell, 2004).

La FSH-p es la gonadotrofina más empleada en el pasado y el presente de la superovulación de hembras bovinas. El tratamiento de superovulación con esta hormona se basa en la administración de dos dosis diarias durante 4 ó 5 días, comenzando en general entre los días 9 y 13 del ciclo estral se emplean también el día 14 del ciclo(Cabodevila&Torquati, 2001).

8.2.1. Esquemas de SOV desde la década de los años 90 hasta el presente.

Para la SOV de las donadoras se utilizaba en la década de los años 90 un protocolo sencillo, que consistía en: la detección del celo de referencia para la SOV, la administración de FSH, pura o como PMSG, desde el día 9 hasta el día 12 del ciclo de referencia para la SOV, acompañado de la administración de prostaglandina, la inseminación al celo observado junto con la aplicación de una fuente de hormona luteinizante para lograr la ovulación y de anti PMSG, cuando se utilizaba esta hormona como fuente de FSH para inducir la superovulación. El protocolo para la sincronización de las receptoras era sencillo si se compara con los complejos esquemas disponibles en la actualidad (Maldonado, 2008).

Desde la del año 2000 se dispone de toda una gama de esquemas de SOV de las donadoras y de sincronización del estro en las receptoras, que han hecho mucho más complejo el tratamiento hormonal de las novillas y de las vacas, han aumentado considerablemente los costos del proceso, representados en la mano de obra, el descarte de cerca de la mitad de las hembras destinadas como receptoras por tener “cuerpo lúteo inapropiado”. Todo lo anterior además, de reducir la rentabilidad global del proceso, debido al número elevado de hembras receptoras descartadas en cada ciclo de transferencia, aumenta el periodo abierto de las hembras que se destinan como receptoras, algún porcentaje de las cuales son descartadas posteriormente por problemas de fertilidad, pero sin tener datos sobre la consecuencia del tratamiento hormonal. Curiosamente, las tasas de respuesta en términos de embriones de calidad para la transferencia en fresco o la congelación, el porcentaje de gestaciones obtenidas con embriones transferidos en fresco o descongelados, y el porcentaje de terneros nacidos, siguen oscilando alrededor de los promedios obtenidos hace más de diez años (Maldonado, 2008).

8.2.2. Esquema Tradicional De la Sov

El esquema de SOV requiere la observación previa del celo de referencia; luego, entre los días 9 y 12 del ciclo estral, se inicia la administración de dosis continuas o decrecientes de FSH a intervalos de 12 horas (esquema AM-PM); al tercer día de tratamiento se administra una dosis de PGF_{2α}; y al celo inducido por esta aplicación se realizan entre dos y tres IA con intervalo de 12 horas; además, se aplica una dosis exógena de hormona luteinizante (LH) con la primera y segunda IA, la recolección de los embriones se hace al día 7 u 8 después de la IA. La determinación de esta metodología se estableció de manera empírica, cuando se verificó que los tratamientos de SOV iniciados en la mitad del ciclo estral presentaron mejores resultados que aquellos iniciados en otras fases del ciclo. Estudios posteriores sobre la fisiología de la dinámica folicular en hembras bovinas han permitido sugerir que el inicio del tratamiento con FSH exógena coincida con el surgimiento de la segunda oleada de desarrollo folicular del ciclo estral (Maldonado, 2008).

La necesidad de mejorar las tasas de colección de embriones, prescindir de la observación del celo de referencia para la SOV y para las receptoras, condujo a la implementación de diversos esquemas tendientes a lograr una mejor respuesta al tratamiento SOV y practicar la IA a tiempo fijo, con lo cual se podrían programar más donadoras y receptoras en un mismo ciclo de TE. Como se expondrá a continuación, estos esquemas de SOV han logrado mejorar la eficiencia del manejo de donadoras y receptoras, han aumentado el costo de los tratamientos representados en la mano de obra y los insumos, pero no han mejorado significativamente el promedio de embriones de grado I y II recolectados, ni las tasas de gestación. Curiosamente, ningún estudio ha informado sobre los efectos que los esquemas hormonales administrados en los programas de TE, podrían tener en donadoras y receptoras a mediano y largo plazo (Maldonado, 2008).

8.3. Protocolos a tiempo fijo

La sincronización de la ovulación por métodos hormonales en bovinos ha presentado resultados animadores para el empleo de la I.A. a tiempo fijo (I.A.T.F.). Los protocolos de sincronización existentes permiten realizar la IA a tiempo fijo (en horario predeterminado), sin la necesidad de observar el estro, facilitando el manejo del rodeo y optimizando el empleo de esta biotecnología a campo (Pellerano *et al.*, 2003). Los resultados de los tratamientos superovulatorios durante el desarrollo de la técnica de transferencia de embriones han sido muy variables; sin embargo, en la búsqueda de mejoras para la producción de embriones se han diseñado protocolos que sincronizan los eventos fisiológicos y endocrinos que ocurren durante el crecimiento folicular y la ovulación, a la vez que facilitan el manejo de las hembras donadoras. El uso de los tratamientos superovulatorios con Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) constituye uno de estos alcances logrados. Aunque, la transferencia de embriones en fresco ha demostrado tener mejores resultados que los obtenidos con embriones congelados, la baja disponibilidad ocasional de hembras receptoras, hace que sea necesario mejorar la técnica hacia la producción de embriones con capacidad para ser criopreservados (Roa *et al.*, 2013).

8.3.1. GnRH

Es posible sincronizar la emergencia de una onda folicular con una inyección de GnRH. En las vacas que tienen un folículo dominante en crecimiento (de al menos 10 mm de diámetro), el tratamiento con GnRH induce la liberación de LH y la ovulación, y la emergencia de una nueva onda de maduración folicular aproximadamente 2 días más tarde. El desarrollo de un esquema de sincronización de la ovulación con GnRH para IATF (Ovsynch) para vacas lecheras lactantes. La primera inyección de GnRH es seguida por una inyección de PGF 7 días más tarde y 48 horas después se coloca una segunda inyección de GnRH; la IATF se

realiza entre las 0 y 24 horas más tarde, siendo el óptimo entre las 16 y 18 horas. El protocolo Ovsynch ha sido mucho más eficaz en las vacas de leche lactantes que en vaquillonas. Aunque no se conoce la causa de esta discrepancia, la ovulación luego de la primera inyección de GnRH ocurrió en el 85% de las vacas pero solo en el 54% de las vaquillonas (Bo. *et al.*, 2007).

8.3.2. Pre-sincronización de GnRH

Una alternativa para superar la variación en las respuestas con respecto a la emergencia de la onda folicular luego de la administración de GnRH es asegurarse que un folículo dominante viable presente al momento del tratamiento a través de la pre-sincronización (Moreira et al, 2001). Si la GnRH es administrada durante la fase de crecimiento temprano del folículo dominante, puede que la ovulación en respuesta a la liberación de LH no ocurra, por lo tanto no habrá emergencia de una onda folicular. Moreira 2001 sugirió que las vacas responderán mas consistentemente a los protocolos con GnRH si estos son iniciados entre los días 5 y 12 del ciclo; y que esto puede ser logrado a través de la pre-sincronización antes de la primera inyección de GnRH La pre sincronización tanto con una o dos dosis de PGF con 14 días de intervalo ha demostrado mejorar las tasas de preñez en los protocolos Ovsynch(Bo., 2002).

Estudiando la dinámica folicular durante el tratamiento “Ovsynch” se verifico que después de la aplicación de GnRH ocurre la ovulación entre 24 a 32 horas; esos resultados demuestran una gran eficiencia del método “Ovsynch” en la sincronización de ovulación en bovinos(Pellerano, 2003).

Los resultados de los tratamientos superovulatorios durante el desarrollo de la técnica de transferencia de embriones han sido muy variables; sin embargo, en la búsqueda de mejoras para la producción de embriones se han sido diseñado protocolos que sincronizan los eventos fisiológicos y endocrinos que ocurren durante el crecimiento folicular y la ovulación, a la vez que facilitan el manejo de las hembras donadoras. El uso de los tratamientos superovulatorios con

Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) constituye uno de estos alcances logrados. Aunque, la transferencia de embriones en fresco ha demostrado tener mejores resultados que los obtenidos con embriones congelados, la baja disponibilidad ocasional de hembras receptoras, hace que sea necesario mejorar la técnica hacia la producción de embriones con capacidad para sercriopreservados (Roa *et al.*, 2013).

8.4. Protocolo de Sov con implantes de progesterona y estradiol

Los progestágenos son compuestos similares a la progesterona que están en el mercado desde hace varios años. Dentro de éstos podemos citar a los progestágenos de administración oral como el acetato de melengestrol (MGA), los implantes subcutáneos de norgestomet y los dispositivos intravaginales con progesterona p4(Bo., 2002).

El esquema de SOV tradicional posee algunas dificultades como la necesidad de detectar el celo de referencia para la SOV, la variabilidad individual en el día de emergencia de la segunda onda de crecimiento folicular y la detección del estro para la IA. Para sobrellevar estos inconvenientes, se han implementado los métodos basados en el uso de dispositivos para la liberación de progesterona subcutáneos o intravaginales, solos o combinados con la aplicación de estrógenos, donde no es necesario un celo de referencia para iniciar el esquema. Se argumenta que dicho esquema promueve la atresia del folículo dominante (FD) presente al momento de iniciar la SOV y, por consiguiente, origina una nueva onda folicular, aproximadamente a los cuatro o cinco días después del inicio de los tratamientos. Este esquema presenta dos ventajas: puede iniciarse en cualquier día del ciclo estral y elimina la necesidad de observación del celo de referencia para la SOV, además de lograr una respuesta semejante a la obtenida con el tratamiento tradicional. Sin embargo, todavía se requiere detectar el estro para la inseminación artificial de las donadoras(Maldonado *et al.*, 2008).

El desarrollo de los tratamientos que controlan las ondas de desarrollo folicular ha dado como resultado varias posibilidades para precisar el momento de la ovulación. La emergencia de ondas foliculares puede ser controlada mediante la ablación guiada por ultrasonido del FD, con tratamientos de FSH iniciados 1 ó 2 días después, o mediante la inyección de estradiol combinado con progesterona al momento de la inserción del implante de progesterona, seguido de la aplicación de FSH a los 4 días. Estos esquemas son los más usados para la SOV, porque ofrecen la conveniencia de iniciar tratamientos rápidamente, sin reducir el número de embriones viables (Maldonado *et al.*, 2008).

Los esquemas en los cuales el momento esperado de la ovulación era atrasado de 6 a 12 horas y la ovulación se inducía por administración de LH o GnRH fue evaluado, no aumentaron significativamente el número de embriones viables, pero permitieron controlar la ovulación y practicar la IA a tiempo fijo (45). Además, se demostró que al mantener los niveles plasmáticos promedios de progesterona entre 1.5 a 2.5 ng/ml después de la última aplicación de FSH, se podría perjudicar el desarrollo embrionario. Estos resultados sustentan de manera indirecta la asociación entre los niveles sub-luteales de P4 y la baja respuesta ovulatoria (Maldonado *et al.*, 2008).

Los tratamientos consisten en la colocación de 1 o 2 implantes subcutáneos en la oreja del animal y la administración IM de una solución inyectable oleosa que contiene 3 mg de norgestomet y 5 mg de EV. Se comienza la superovulación a los 5 días de la inserción del implante y la administración del EV + N IM. Sin embargo cuando se comparo el uso del EV con el de 17 β -estradiol se observo que el intervalo tratamiento-onda fue más variable con el EV (3 a 8 días) que con el estradiol (3 o 4 días) (Becaluba, 2007).

8.5. Esquema denominado P-36

En el protocolo P36 la fuente de progesterona se mantiene hasta 36 horas después de la aplicación de PGF_{2 α} y 12 horas más tarde con la administración de

LH se induce la ovulación, la cual ocurre entre 24 y 36 horas después de la inyección. Una de las desventajas encontradas es que se pueden formar cuerpos lúteos accesorios que aumentan los niveles plasmáticos de progesterona y, en consecuencia, las tasas de gestación a los 83 días post-transferencia son menores que en el grupo control. Un estudio demostró que el implante de progesterona puede ser removido a las 24 o 36 h después de la aplicación de PGF_{2α}, sin que afecte la respuesta SOV o la calidad de ovocitos/embriones en vacas *B. indicus*(7). No obstante, dada la escasa información disponible y las bajas tasas de preñez observadas con el P-36, se debe esperar a tener suficientes estudios clínicos controlados, antes de recomendar su aplicación en la TE comercial (Maldonado *et al.*, 2008).

9. Sincronización de receptoras

En programas de TE, generalmente se utilizan tratamientos con dos dosis de PGF con 11 a 14 días de intervalo y detección por 5-7 días después de la segunda aplicación de PGF. En programas de TE, generalmente se utilizan tratamientos con dos dosis de PGF con 11 a 14 días de intervalo y detección por 5-7 días después de la segunda aplicación de PGF. Finalmente, la selección del programa más adecuado dependerá de otros factores no fisiológicos como la eficiencia de la detección de celos, destreza del veterinario en la palpación rectal, dinero disponible por hembra para gastar en tratamientos, costo de la dosis de semen o del embrión, disponibilidad de mano de obra calificada, instalaciones disponibles y fundamentalmente de los objetivos del programa de mejoramiento genético del establecimiento(Bo. *et al.*, 2006).

9.1. Prostaglandina F_{2α}

Hormona que en forma natural, es producida por el endometrio y actúa en el último período del ciclo, causando la regresión del cuerpo lúteo y así reanudando el siguiente ciclo. La base de su éxito consiste en la aplicación del producto en el

momento que la hembra presenta cuerpo lúteo. Para la inducción y sincronización del estro en vaquillas y vacas, se administran 0.150 mg de $\text{PgF}_{2\alpha}$ y el estro se manifiesta alrededor de 48 a 72 horas después de la inyección, pudiéndose observar incluso hasta las 96 horas (Salas, 2010).

Las GnRH, son hormonas producidas por el hipotálamo que actúan sobre la hipófisis estimulando la liberación de LH y FSH. De manera de actuar sobre el crecimiento folicular, y con la PGF la regresión del cuerpo lúteo. Un esquema de sincronización de la ovulación utilizando GnRH para la IA a tiempo fijo llamado Ovsynch. La administración de una GnRH a una vaca con un folículo dominante en crecimiento induce la ovulación de éste con la emergencia de una nueva onda folicular aproximadamente 2 días más tarde. El tratamiento con PGF 6 o 7 días después de la GnRH resulta en la ovulación del nuevo folículo dominante, especialmente cuando una segunda inyección de GnRH fue aplicada a las 48 horas después de la PGF, realizando una IA a tiempo fijo entre las 16 - 18 horas después de la última aplicación de GnRH (Huanca, 2001).

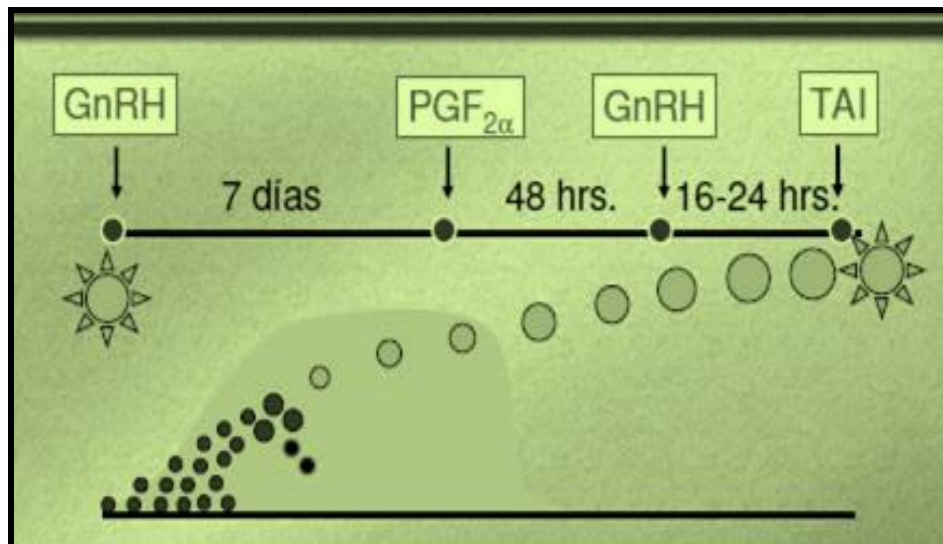


Figura 1. Sincronización de receptoras (**Ovsynch**) fuente:

<http://jairoserano.com/2010/06/ovsynch-y-sus-variaciones/>

10. Factores a considerar en los programas TE.

10.1. Ambiental.

El estrés calórico puede comprometer los eventos reproductivos que intervienen en el desarrollo embrionario, bajando la intensidad de la manifestación del estro durante el estro, alterando el crecimiento folicular, comprometiendo la competencia de los oocitos, e inhibiendo el desarrollo embrionario (Oyuela & Jiménez, 2010). Las vacas lactantes son más sensibles a altas temperaturas debido al calor generado mediante el incremento del metabolismo, asociado con el aumento en la ingesta de alimento para la producción láctea. Al parecer, hay una interacción negativa entre la producción láctea y el estrés calórico con el desempeño reproductivo en vacas lecheras (Maldonado et al, 2008).

10.2. Manejo

En las diferentes explotaciones es normal que se presenten diferentes administraciones que alteren los resultados de los programas, como por ejemplo, el tipo y la cantidad de suplementación de mineral que se suministra, la disponibilidad de forrajes verde en potreros, la disponibilidad de forraje almacenado, tipo de silo y/o heno, el estrés causado por malas prácticas pecuarias como golpes, uso de chicharras. En síntesis factores que afecten el bienestar animal (Oyuela & Jiménez, 2010).

10.3. Nutrición

Durante el proceso de selección se efectúa una escogencia minuciosa de los animales a trabajar tanto donadoras como receptoras evitando al máximo el uso de animales con Condición Corporal (CC) extremas, gordas o flacas, y llevando un registro de las condiciones de manejo para optimizar cada uno de los procesos.

De tal forma que las mejores tasas de preñes se obtienen cuando los valores son intermedios, de 2 a 3 en la escala de 1 a 5. En receptoras de embriones con estas condiciones corporales se reportan tasas de preñez entre 53 y 55%, y son inferiores para las condiciones extremas de 1 y 4 o más (44 y 47% respectivamente) (Oyuela & Jiménez, 2010).

10.4. Monta natural/inseminación

El uso de un semen de alta calidad y la IA a las 12-24 horas tras el inicio del reflejo de inmovilidad del celo. Las inseminaciones repetidas no parecen proporcionar unos mejores porcentajes de fertilización. Se han reportado diferencias entre toros (Becaluba, 2007). También se debe examinar la calidad seminal, donde se mide el: volumen, densidad, motilidad, % de vivos y muertos y el % de anomalías espermáticas (Méndez *et al*, 2006).

10.5. Edad

El número de embriones transferibles obtenidos en donantes cuyas edades estaban comprendidas entre 3 y 6 años, resultó mayor que el que se logró en vaquillonas y primíparas. Por su parte Se efectuó un estudio retrospectivo en el que analizó la respuesta superovulatoria de 197 donantes, agrupándolas en tres categorías, hasta 5 años, de 6 a 8 años y mayores de 8 años. El promedio de embriones transferibles fue 5,2. 6. Y 3,2 respectivamente (Becaluba, 2007).

10.6. Sanidad

Muchos factores influyen en la ciclicidad de la donadora/receptora: el balance energético, la nuliparidad, el número de partos, la producción láctea y las enfermedades infecciosas de la reproducción se ve comprometida por los efectos en la fertilización y en la sobrevivencia embrionaria. Las vacas con la mayor temperatura corporal rectal, tuvieron baja probabilidad de gestación y alta

probabilidad de pérdida de embriones en cuanto a la receptora. Las vacas lactantes son más sensibles a altas temperaturas, asociado con el aumento en la ingesta de alimento para la producción láctea. Para contrarrestar un poco estos factores negativos y aumentar las tasas de gestación, se recomienda el uso de embriones frescos en los programas de TE (Maldonado *et al.*, 2008).

11. Dificultad al momento de la transferencia.

El hecho de depositar un embrión en el interior del cuerno uterino supone una invasión del tracto reproductivo; este procedimiento está asociado a posibles lesiones del endometrio y a la consecuente producción de PGF₂-alfa, lo que reduciría los índices de preñez. En presencia de algunos problemas donde se incluyen movimientos bruscos de la receptora, receptoras problemáticas o evidencias de sangre en la pistola de TE. Esto resulta en 53% de preñez para las TE sin dificultad frente a 21% de preñez en los casos en los que hubo alguna dificultad (Oyuela & Jiménez, 2010).

12. Transferencia quirúrgica

La primera transferencia quirúrgica con éxito en bovinos fue lograda por Willet y Col. en 1951. Los autores practicaron la cirugía bajo anestesia general, con el animal en posición decúbito dorsal y por la línea media. El cuerno uterino ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo era presentado para ser punzado. Una pipeta -conteniendo el embrión- era introducida a través del punto de punción y el embrión era expulsado en la luz uterina en un volumen mínimo de medio (0,2 ml). AVERY y col. 1962 simplificaron la técnica quirúrgica transfiriendo los embriones a la receptora en pie y por el flanco. A fin de determinar a priori qué cuerno era el ipsilateral a la ovulación, se procedió a palpar previamente a las receptoras (Palma, 2001).

La elección del flanco a incidir lo determina el ovario ovulado. Esta laparotomía lateral es adoptada en la actualidad para una parte de las transferencias de embriones. La anestesia local puede ser complementada con una paravertebral (60 ml de Procaina 2% en plano). La transferencia es practicada a través del borde dorsal en el tercio anterior del cuerno. Los problemas de esta técnica lo constituyen: la dificultad de exteriorizar el cuerno uterino sin causar traumas en el tracto genital, especialmente en vaquillonas, vacas muy grandes y gordas. El embrión puede ser transferido con una pipeta Pasteur o pajuela plástica (0,25 - 0,50 ml). La sutura se hace según los métodos de rutina. La preñez con esta técnica varía entre 70-80%, con embriones frescos y aproximadamente 10% menos con embriones congelados. Una variante quirúrgica posible es la extracción del cuerno por el fondo de la vagina. Se practica una incisión con un bisturí oculto en la pared dorsal del fondo de la vagina entre su pared dorsal y la cérvix (Palma, 2001).

Esta zona tiene escasa irrigación. Se debe empujar la cérvix hacia abajo antes de punzar para evitar lesionar el recto. A través de la incisión se extrae el cuerno uterino llevándose a cabo la deposición del embrión (Palma, 2001).

13. Transferencia no quirúrgica

En bovinos, la transferencia de embriones a través del cérvix comenzó a ser utilizada en trabajos experimentales en 1949. Dificultades de distinta índole que se presentaron en el desarrollo del método hicieron que el nacimiento del primer ternero se produjera en 1964. En las últimas décadas, los porcentajes de preñez se han incrementado de manera significativa posibilitando actualmente obtener porcentajes de alrededor del 60%, aún con la transferencia de embriones congelados (Cutiniet *al.*, 2000). Es la técnica de elección en la actualidad. La primera transferencia no quirúrgica con éxito en bovinos fue lograda por Mutter en

1964, atravesando la cervix con una pipeta de inseminación. El éxito fue precedido, sin embargo, de muchos fracasos como consecuencia, aparentemente, de infecciones y contracciones uterinas provocadas en el intento(Ruizet *al.*, 2010).

Las Técnicas no quirúrgicas implican el paso de un catéter balón a través del cuello uterino y en uno de los cuernos uterinos en días 6 a 8 después del estro. Una vez que el catéter está en su lugar, el mango se infla con solución salina o medio de lavado.Figura 2 y 3. Hay dos tipos básicos de catéteres para no-quirúrgicos recolección de los embriones. Los informes originales se concentraron en la utilización de dos y tres vías catéteres Foley. Muchos grupos usan el catéter de Foley como es barato y fácilmente disponible. Sin embargo, el caucho es suave y el catéter es difícil para enroscar en el cuerno uterino. Además, la distancia entre el manguito y la punta del catéter es corta. El catéter Rusch bidireccional por donde es expulsado el embrión, es preferido por muchos. Es de 67 cm largo, 14 o 18-calibre. La punta después del globo mide 5,5 cm y tiene cuatro agujeros. El catéter se refuerza para el paso a través del cuello uterino por un stilette de acero inoxidable(Mapletoft, 2013).

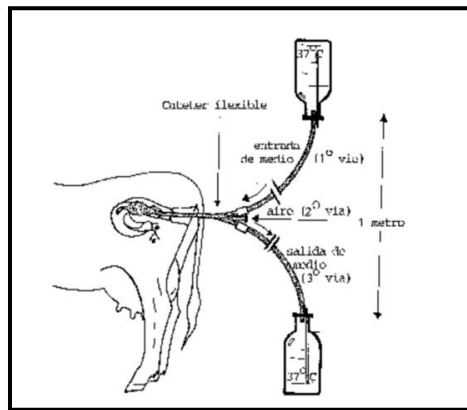


Figura 2. Esquema de circuito cerrado con flujo continuo (palma, 2001).

La rigidez de este catéter permite introducirlo más fácilmente a través de la cervix de vaquillonas que los de plástico. Estos últimos son más finos que los metálicos, debido a su flexibilidad de elección para vacas multíparas, se presentan estériles y

son descartables. Al comienzo de la década del '80 se estableció como el lugar óptimo para la transferencia quirúrgica del embrión el tercio anterior del cuerno uterino, basado en que los embriones día 7-8 se localizan en el útero a 5-6 cm de la unión útero-tubárica(Ruiz *et al.*, 2010).

El procedimiento de la transferencia no quirúrgica tiene la desventaja frente al quirúrgico de requerir destreza, experiencia y particularmente mucho cuidado en la manipulación del catéter en el cuerno y el cuerpo del útero. El trauma provocado, especialmente en el endometrio, puede provocar la liberación de prostaglandinas. Estas pueden causar respuesta inflamatoria, disminución de los niveles de progesterona y aumento de la contractilidad uterina, que interfieren con la vida media del cuerpo lúteo y en consecuencia con la sobrevivencia del embrión. Con el aumento del tiempo de manipulación también se incrementa el efecto traumático de la transferencia, cuando la maniobra de transferencia dura más de 3 minutos o si es llevada a cabo con torpeza se provoca irritación del endometrio, que puede conducir a una disminución del éxito de la transferencia(Ruiz *et al.*, 2010).

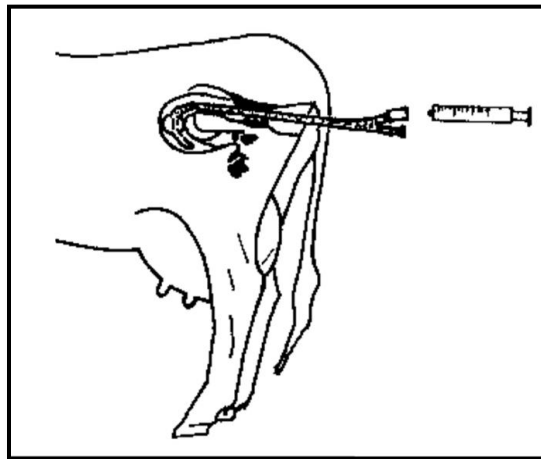


Figura 3. Esquema de circuito abierto con flujo discontinuo. Inyección y recolección con jeringa (palma, 2001).

14. Anestesia epidural.

Se corta el pelo de la base de la cola y se desinfecta el lugar con alcohol al 70% Y se procede a colocar 5 ml de xilocaina al 2% entre el sacro y la primer vértebra coccígea. El lugar correcto de la inyección puede ser confirmado por la presión negativa que se encuentra. (si el lugar es el adecuado, cuando se colocan unas gotas de anestésico a la aguja, estas son aspiradas) (Ortiz *et al.*, 2001).

15. Obtención de embriones

Entre el sexto y octavo día(día 0= día del celo) se produce la obtención de embriones, ya que antes de este momento algunos embriones pueden permanecer aun en los oviductos. Actualmente se utilizan catéteres de obtención transcervical.Figura 4. Provistos de un balón insuflable en su extremo que permite crear un compartimento estanco en la parte distal del cuerpo uterino y proceder al arrastre de los embriones allí localizados.Figura 5. El medio de arrastre más utilizado es una solución tampón fosfato-salina de pH= 7, suplementando con antibióticos y proteínas, suplementada con 1% de suero o 0,1% de albúmina sérica (PBSS). Después de la colección embrionaria las donadoras reciben una inyección de $PgF2\alpha$, con el objeto de inducir la regresión de los cuerpos lúteos, evitar una posible gestación, incluso múltiple y acortar el periodo entre colecciones(De La Fuente, 2013).

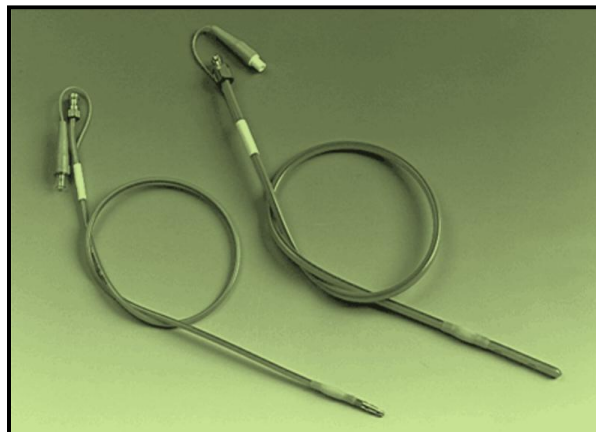


Figura 4. Catéter flexible(Palma, 2001).

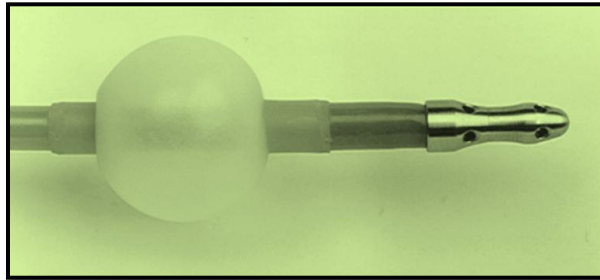


Figura 5.Catéter insuflable(Palma, 2001).

Por otra parte una evaluación morfológica detallada, a mayor aumento, considerando estadios de desarrollo y cualidades estructurales permite determinar que embriones están en condiciones de ser transferido, la transferencia en fresco se debe de realizar dentro de la 3-4 hs post-recolección (Cabodevila&Torquati, 2001).

| Compuesto | Colecta g/l | Mantenimiento g/l |
|---------------------------|-------------|-------------------|
| NaCa | 8.00 | 8.00 |
| KCl | 0.20 | 0.20 |
| CaCl | 0.10 | 0.10 |
| MgCl | 0.10 | 0.10 |
| NaHPO (2H ₂ O) | 1.15 | 1.15 |
| KHPO | 0.20 | 0.20 |
| ADITIVOS | | |
| Penicilina | 100 UI | 100 UI |
| Estreptomicina | 100 µg | 100 µg |
| Fungizona | 25 µg | 25 µg |
| Suero fetal* | 1-2% | 1-2% |
| Piruvato | 0.33 mM | 0.33 mM |
| Glucosa | 1 mg | 1 mg |

* Otros sueros pueden ser: Suero de ternero recién nacido (NCS), albúmina sérica bovina (BSA) o suero de novillo (steer serum o donor serum). Todos deben ser inactivados por calor y estar libres de toxinas y agentes patógenos.

Cuadro 1.Composición del medio para colección y mantenimiento de embriones. (Salas, 2010).

15.1. Instrumentos(Méndez et al., 2006):

- Catéter de Foley (16, 18 ó 20 G) ó catéter balón para vacas. Mandril para el catéter de Foley. Dilatador de cérvix. Manguera de silicona con conectar en Y, pinzas de Kocher o clamps.
- Filtro para embriones (Em Con, Curtíss, FHK, etc.).
- Jeringas desechables de 5, 20 Y 50 ml y agujas.
- Inyector intrauterino
- Guantes de palpación.
- Algodón.
- Toallas de papel.

15.2. Fármacos y desinfectantes(Méndez et al., 2006):

- Alcohol etílico al 70% Desinfectante (Cloruro de Benzalconio al O, 1 %)
- Xilocaina al 2%.
- Solución de iodopovidona al 2% (2mg Yodo disponible por ml. Prostaglandina).

16. Búsqueda y manejo de los embriones.

Los embriones se buscarán a 10X o 15X aumentos (Salas, 2010). El medio de colección se deja sedimentar en una probeta de 500 ml por 20-30 minutos, luego de finalizada la colección. El sobrenadante se extrae por sifón hasta que el medio baje a la marca de 50 ml. Lo que queda en la probeta se coloca dentro de placas de Petri estériles y descartables (100 x 15 mm) y se busca con una magnificación de 10X. Se pasa el sobrenadante (450 ml) por un filtro de de50µm como paso final para recuperar cualquier óvulo o embrión que haya quedado (Méndez et al., 2006).

Actualmente también se puede filtrar directamente todo el medio de colección utilizando filtros descartables estériles. Finalizando el filtrado se lava el filtro con PBS utilizando una jeringa y aguja fina y el fluido de lavado es colectado en una caja Petri y se procede a la búsqueda. Se pone una placa cuadrículada debajo de la placa Petri para facilitar la búsqueda. En cada placa se busca dos veces, más luego de encontrado el último embrión. Finalizada cada búsqueda se realiza un movimiento rotativo con la placa para despegar algún posible embrión adherido a los bordes. A medida que se van encontrando los embriones se los va colocando en una placa de Petri chica que contiene el medio de mantenimiento (PBS + 10-20% FCS). Para cambiar los embriones de placa se utiliza una micropipeta conectada a una jeringa de 1 ml, (tuberculina) o catéter estéril. Cuando la búsqueda se ha completado los embriones son evaluados y colocados en el medio de mantenimiento (Méndez et al., 2006).

17. Desarrollo embrionario. Nomenclatura

Después de su liberación, el ovocito es "atrapado" por las fimbrias del infundíbulo y dirigido al interior del oviducto a través de la actividad ciliar. El ovocito bovino, fertilizado o no, es una célula de 150-190 μ m de diámetro, incluyendo a la zona o membrana pelúcida, una capa acelular de glicoproteína de 12 a 15 μ m de espesor producida por el ovocito. En la ampolla del oviducto la fecundación desencadena el comienzo del desarrollo previo a la nidación del embrión. Pocas horas después de la fusión nuclear el cigoto comienza a dividirse. La división nuclear es mitótica y las nuevas células se denominan blastómeros. El desarrollo del embrión hasta los 8 días ocurre dentro de la zona pelúcida. En los primeros 6 días de desarrollo no se manifiesta aumento de tamaño, sólo el incremento del número de blastómeros. (Palma, 2001).

La edad del embrión es establecida a partir del día del estro d0. Al d1 le corresponde la ovulación. De esta forma entre 24 y 36 h después de la fertilización el cigoto de una célula se divide en 2 células ovas d2; 24 h más tarde d3 el embrión cuenta ya con 4 células. La división de los blastómeros puede cumplirse en forma asincrónica, razón por la cual es posible observar en estadios tempranos un número impar de células (Palma, 2001).

El intervalo entre la división más temprana y la más tardía es de alrededor de 4hs. Hasta el estadio de 8 células (d4) el cigoto es transportado a través del oviducto. El día 5 aproximadamente se produce el ingreso al cuerno uterino en estadio de 16 células, momento a partir del cual es posible obtener el embrión en forma no quirúrgica y evaluarlo de acuerdo a su estadio y calidad (Palma, 2001).

18. Evaluación Embrionaria

Los embriones se clasifican de acuerdo con dos criterios: grado de desarrollo y calidad. La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), han designado un número progresivo para los diferentes estadios de desarrollo y para la calidad del embrión. (Salas, 2010).

Cuadro 2. Criterio de clasificación para embriones bovinos (Palma, 2001).

| Grado de desarrollo | Clave | Edad del embrión | No. De células |
|-------------------------------|-------|------------------|----------------|
| Ovulo | 1 | | |
| 2 a 16 blastómeros | 2 | 2 - 4 días | 2.-16 |
| Mórula temprana | 3 | 5 días | > 16 |
| Mórula compacta | 4 | 6 días | 32 - 64 |
| Blastocito temprano | 5 | 7 días | 160 |
| Blastocito maduro | 6 | 7 días | 180 |
| Blastocito expandido | 7 | 8 días | 200 |
| Blastocito en eclosión | 8 | 9 días | > 200 |
| Embrión eclosionado | 9 | | |

18.1. Embriones transferibles

Con base a sus características morfológicas, cada embrión recibe una clasificación por su edad y calidad. Figura 6.

- a) **Mórula.** Una masa de al menos 16 células. Blastómeros individuales son difíciles de distinguir unos de otros. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del embriónperivitelino (Méndez.et al., 2006).
- b) **Mórula compacta.** Debido a la compactación, las uniones de los blastómeros han formado una masa celular compacta, de manera que ya no se aprecian los blastómeros individuales. El embrión ocupa del 60 al70% del espacio perivitelino, edad estimada 5 días (Mapletoft, 2013).
- c) **Blastocito temprano.** En la masa celular aparece una diminuta cavidad llena de líquido llamado blastocele. Aquí las células empiezan a diferenciarse. El embrión ocupa del 70 al 80 % del espacio perivitelino. La diferencia visual entre el trofoblasto y la masa celular es apreciable (Mapletoft, 2013).
- d) **Blastocito maduro.** Se observa las células del tabique embrionario (disco embrionario), que originan al embrión y a las células del trofoblasto. El embrión tiene apariencia de anillo y ocupa el 90% del espacio perivitelino. (Méndez.et al., 2006).
- e) **Blastocito expandido.**d 7-8, más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente (1,2 a 1,5x), con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida a 1/3 de su espesor original. La presión creciente del blastocito en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su protrusión. Los embriones recuperados en este estadio se pueden colapsar temporalmente, esto se caracteriza por una pérdida completa o parcial del blastocele(Palma,. 2001)

- f) **Blastocito en eclosión.** El embrión tiene fisurada la zona pelucida por donde eclosiona paulatinamente hasta salir totalmente de ella, el embrión puede tener ya sea la forma esférica de un blastocito expandido o bien estar colapsado (Mapletoft, 2013).

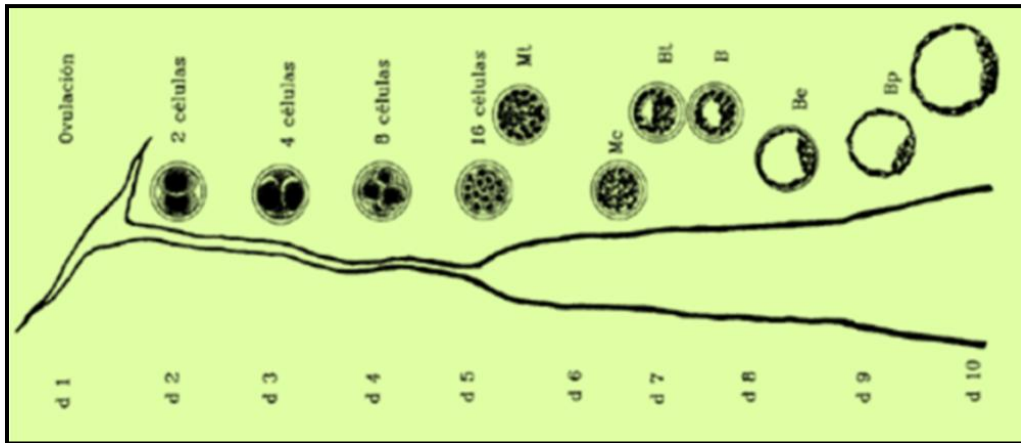


Figura 6. Etapas de embrión (Mapletoft, 2013).

18.2. Clasificación de embriones

Excelente: un embrión ideal, esférico, simétrico y con células de tamaño uniforme, color y textura.

Bueno: diminutas imperfecciones, como pocos blastómeros, forma irregular y algunas vesículas.

Justo: se observan problemas que son más definidos, incluyendo presencia de blastómeros extruidos, vesiculación y unas pocas células degeneradas.

Pobre: Los problemas severos, numerosos sacaron blastómeros, degeneró células, células de tallas (tamaños) variadas, vesículas grandes y numerosas, pero una masa del embrión por lo visto viable. Éstos no son generalmente de la calidad transferible (Mapletoft, 2013).

19. Conservación de embriones.

El cultivo es utilizado para evaluar el resultado de distintas manipulaciones (congelación, micromanipulación, etc.) que se efectúan con los embriones pero no como un paso previo a la transferencia. Esto obedece a dos razones principales: En primer lugar, a que los embriones continúan desarrollando durante el cultivo, por lo tanto, esta técnica no puede ser utilizada para conservar un embrión hasta que una receptora asincrónica alcance el sincronismo óptimo. El cultivo de embriones se realiza en medios cuyo pH oscila entre el 7,2 y 7,6 y cuya osmolaridad varía entre 270 y 310 mosm. Al medio de cultivo, al igual que al de recolección, se le incorpora una fuente de proteínas. Esta se efectúa con la suplementación del medio de cultivo con 10% de suero ó 0,4% de albúmina. (Cabodevila&Torquati, 2001).

La suplementación proteica tiene distintos fines, los más importantes(Cabodevila&Torquati, 2001). Son:

- Reducir la tensión superficial para favorecer la sedimentación de los embriones y evitar que estos se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación.
- Incorporar sustancias promotoras del crecimiento que favorecen el desarrollo embrionario.
- Absorber e inhibir metales pesados tóxicos que pueden estar presentes en el medio.

19.1. Refrigeración 0-4°C

La refrigeración se efectúa vehiculizando los embriones en PBSS envasados en pajuelas de 0,25 ml y colocadas en un refrigerador (común o portátil) Se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura, de manera similar a

como se realiza la estabilización durante la congelación de semen (Cabodevila&Torquati, 2001).

- Utilizar eficientemente donante 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.
- Conservar razas en vías de extinción.
- Crear bancos de germoplasma de valor pecuario(Cabodevila&Torquati, 2001).

19.2. Método de congelación standard

La deshidratación parcial de los embriones se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación.El método de congelación estándar fue desarrollado por Wilmut y Rowson en 1973, en este método la exposición de los embriones al medio de congelación (PBS + G) debe realizarse a temperatura ambiente (20 - 22 °C), en un solo paso. Las pajillas deben ser colocadas en un equipo de congelación a -7 °C durante 5 minutos para equilibrar la temperatura de las pajillas con la del equipo; se realizaponiendo en contacto la superficie de la pajilla con una placa metálica enfriada con nitrógeno líquido, el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido alcohol o etanol (Nivia, 2013).

Existe otro método de congelación rápida que fue desarrollado por Chupin 1986. Los embriones son deshidratados parcialmente como ocurre en el método estándar, luego se les deshidrata nuevamente colocándolos en una solución mixta de glicerol y sucrosa. Esta segunda deshidratación deja a los embriones en condiciones de ser enfriados rápidamente. Las pajuelas son colocadas en el

cuello del termo de nitrógeno, durante 5 minutos, posteriormente son sumergidas al NL. (Nivia, 2013).

19.3. Vitrificación

La vitrificación es una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene los agentes crioprotectores con las células y el nitrógeno líquido. La definición física de la vitrificación es la solidificación de una solución a baja temperatura sin que ésta llegue a cristalizar debido a un enorme incremento de la viscosidad, manteniendo así la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación. La solución vitrificante utilizada posee crioprotectores en alta concentración que al ser enfriados no cristalizan, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido al sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de allí su nombre (Ruiz *et al.*, 2010).

20. Descongelación

Para descongelar los ovocitos, las microgotas vitrificadas se retiraron del vial criogénico y se expusieron a una solución de 2 ml de TRE 0,3 (La **trehalosa** es un azúcar doble, disacárido) M en SB por 5 minutos sobre una platina temperada a 39 °C y luego los ovocitos se transfirieron a SB por un tiempo no menor de 2 minutos (Ruiz *et al.*, 2010).

21. Clasificación de los crioconservadores

21.1. Penetrantes.

Protegen a las células de los efectos dañinos de la alta concentración de soluto producido en el medio exterior durante la congelación. La cinética de entrada y salida de estos crioprotectores está caracterizado por algunos factores como

cociente de permeabilidad, cociente de temperatura y cociente de reflexión. La adición al crioprotector consiste en pasar el embrión por diferentes concentraciones crecientes de esta sustancia, partiendo de la solución bufferada fosfatada (PBS) hasta una concentración final del crioconservador, mas PBS. El glicerol a 1.4 M permite obtener un elevado porcentaje de viabilidad cuando los embriones son congelados a una velocidad de 0.3" C/ minuto hasta -30 o -35°C. (León, 2006).

21.2. No penetrantes.

Son agentes que mantienen una presión osmótica alta en el medio extracelular durante la eliminación del crioprotector. Esto evita los choques osmóticos debido a la difusión del glicerol hacia fuera después de la descongelación. Si se añade sacarosa a la solución de glicerol, después de equilibrados los embriones, el tamaño de los mismos se reduce en un 30 a 40 % en comparación con los equilibrados solo en glicerol(León, 2006).

Cuando se descongelan embriones en presencia de sacarosa, se limita el movimiento del agua a través de las membranas y así se evita la lisis de las células embrionarias durante la eliminación del glicerol. Este beneficio de la sacarosa se debe a sus propiedades osmóticas, estando involucrado también el transporte activo de iones a través de la membrana (León, 2006).

22. Técnica TE

Técnicas de transferencia de embriones no quirúrgico utilizadas hoy implican el uso de una pipeta de IA y más recientemente, pipetas de transferencia embrionaria especializados. Después de confirmar la sincronía del estro, se refrena el destinatario y el recto es evacuado de las heces. Al mismo tiempo, se confirma la presencia y el lado de un CL funcional. Cuidado para evitar la aerostación del recto con el aire. Se administra anestesia epidural y la vulva se

lavaron con agua (sin jabón) y secarse con una toalla de papel. El embrión está cargado en paja de 0,25 ml entre al menos dos burbujas de aire y la paja se carga en la pipeta de transferencia de embriones. Debe tenerse cuidado para asegurar que la pajilla enclava la envoltura herméticamente para evitar fugas. La vaina está recubierta con lubricante obstétrico estéril, no tóxico y la pipeta forrada se transmite a través de los labios vulvares evitando la contaminación. (Mapletoft, 2013).

El embrión se coloca en el cuerno uterino adyacente al ovario teniendo el CL aprobando la pipeta a través de la cerviz, muy similar a la inseminación artificial. Sin embargo, una tentativa se hace generalmente para pasar la pipeta de transferencia por lo menos a medio camino abajo el cuerno uterino. El lumen uterino debe ser alineado antes de su transferencia con el fin de evitar traumatismos en el endometrio durante el paso. El embrión es depósito lenta y firmemente mientras retira ligeramente la punta de la pipeta de transferencia. Práctica y destreza parecen mejorarla capacidad de alcanzar las tasas de embarazo alta sugiriendo que el trauma al endometrio puede ser un factor limitante con este método de transferencia de embriones. Estimulación de la cérvix y la introducción inadvertida de contaminantes bacterianos no parecen ser importantes determinantes de las tasas de gestación en circunstancias normales. Con práctica y atención al detalle, las tasas de gestación con las transferencias no quirúrgico pueden igualarlos de transferencias quirúrgicas (Mapletoft, 2013).

23. Procedimiento

El embrión se carga en la pajueta de 0,25 ml. La pajueta es cargada en primer lugar con medio de cultivo (aprox. 3,5 cm de su longitud), se deja un espacio con aire (1,0 cm) y luego se carga el embrión contenido en el medio. Posteriormente la segunda columna de aire y la última nuevamente con medio (Palma, 2001).

La columna con medio de cultivo (PBSS), ubicada en el extremo abierto de la pajuela, limpia a ésta en el momento de la descarga. La presencia de las columnas con aire impide el desplazamiento de la columna central que contiene el embrión. La última garantiza la descarga del embrión por efecto de arrastre (Palma, 2001).

La pajuela es colocada en el catéter de transferencia estéril o conservada en un termo seco con temperatura constante a 20°-37°C. La pistola de transferencia será cubierta por una envoltura plástica (camisa sanitaria), hasta su uso similar a lo realizado en la IA, con la diferencia de atravesar el cérvix y depositar el contenido en el tercio medio del cuerno uterino (Palma, 2001).

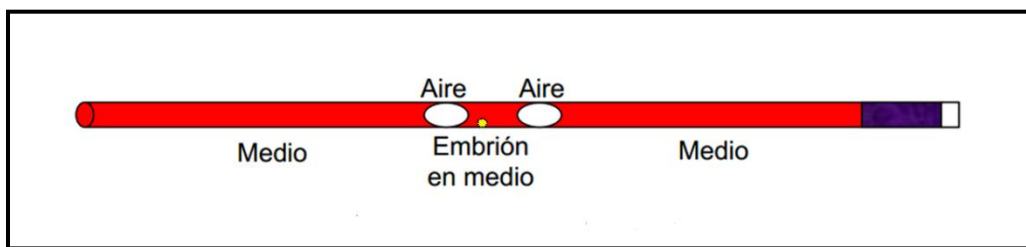


Figura7. Pajuela para embriones (Palma, 2001).

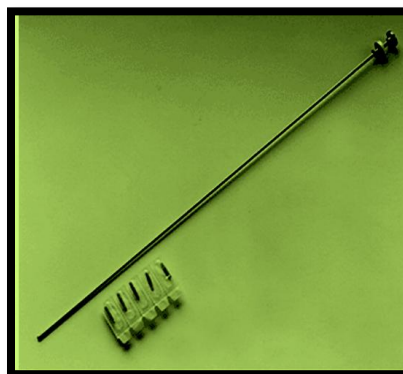


Figura8. Pistola para depositar los embriones (palma, 2001).

24. Conclusiones

La producción de embriones, abarca la superovulación, la maduración y la fecundación de los ovocitos, recolección de embriones de las hembras donantes en la etapa de mórula o blastocito en que están listos para ser transferidos a las hembras receptoras. La receptora no transmite ninguna característica genética a la cría y sólo sirve para mantenerla hasta el parto y durante la lactancia.

Por otra parte determinamos de ante mano que sus costos son elevados, conocimiento, un plan a largo plazo. Y aun más, mano de obra calificada disponible en todo momento para llevar a cabo los procedimientos, controles, análisis, etc. También influye si es viable realizarlo en cualquier sitio, o si existen ciertas exigencias climáticas, alimenticias o de espacio. Esto varía mucho, ya que las condiciones son muy cambiantes dependiendo del lugar.

Bibliografía

Albeiro R. 2001. Manejo De Donantes Y Receptoras. En: GUSTAVO A PALMA. Biotecnología De La Reproducción. Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria. Argentina. pág. 21-26.

Ávila A. INIFAP. Campo experimental “la posta” Veracruz. pág. 1-4. Online: <http://utep.inifap.gob.mx/tecnologias/BOVINO.pdf> Acceso: 26/10/2013

Baruselli P., Ferreira R., Sales, L. Gimenes., Filho; C. Martins; C. Rodriguez; G. Bó. 2011. Timed Embryo Transfer Programs For Management Of Donor And Recipient Cattle. Theriogenology,; pag.1583–1593

Becaluba. F.2007. Factores que afectan la superovulación en bovino. Sitio argentino de producción animal. Online: <http://www.engormix.com/factor/afectan> fecha de acceso 02/11/2013

Belascoain M. G., Díaz É. T., Hüter S. 2010. Técnicas Para La Criopreservación de Embriones Bovinos. Universidad Nacional De Córdoba. IRAC. Pág. 1-19.

Bo. G. A. 2002 fisiología y reproducción; dinámica folicular y tx hormonales para sincronizar la ovulación en el ganado bovino. Memorias XI congreso venezolano de producción e industria animal. pag. 1-17

Bo. G. A., M. CP., Carballo G. D. &Mapletoft. R. J. 2007 Nuevas Alternativas Para La Superovulación De Donantes De Embriones.VII Simposio Internacional De Reproducción Animal. IRAC.Pag 181-196

Bo. G.A.Cutaia L., Baruselli. P.S.2006. Programas De Inseminación Artificial y Transferencia deEmbriones A Tiempo Fijo. Biotecnología de Reproducción en Bovinos.1° Simpósium Internacional de Reproducción Animal Aplicada Pág. 56-81.

Bolívar. P. A.. Maldonado E. J. G. 2008. Proliferación de Esquemas.de Superovulación y Sincronización en la Transferencia de Embriones en Bovinos;¿terapéutica basada en la evidencia o falta de racionalidad?. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. Pág. 436-450

Cabodevila J. &Torquati. S. 2001.superovulacion. En: GUSTAVO A PALMA. Biotecnología de la reproducción, impreso en Argentina, Instituto nacional de tecnología agropecuaria. pág 33-57

Colazo M.G &Mapletoft. R.J.2007. Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. Alberta Agriculture and Rural Development Edmonton. Ciencia veterinaria vol. 9. No. 1. pag 1-18.

Córdova S. A. B. 2011. Protocolos De Sincronización Y Superovulación Para Transferencia de Embriones en Bovinos. Universidad de Cuenca. Escuela De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Pág 1-128.

Cutini A., Teruel M. y Cabodevila J. 2000. Factores Que Determinan el Resultado de la Transferencia No Quirúrgica de Embriones Bovinos. Revista Taurus Nº 8. Pág. 35-47.

De La Fuente M. J. F. 2013. Transferencia De Embriones En Ganado Bovino. Capítulo XXIV. Enciclopedia venezolana. Pág 374-385. Online: <Http://Www.Venezuelaganadera.Com/Transferencia-Bovina> Acceso: 12/11/2013

Forde N, Beltman M, Lonergan P, Diskin M, Roche J, Crowe M. 2011. Oestruscycles in Bostauruscattle. Animal Reproduction Science.Pág.163-169.

Garzón N., R. Urrego y C. Giraldo A. 2007. Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. Rev. Med. Vet. Zoot. Vol 2. Pág 68-77

Herrera C. J. 2010. Ovulación Múltiple Y Transferencia De Embriones En Ganado Bovino. EN; Conejo Nava J. Jesús. Seminario; Manejo Reproductivo Y Biotecnologías Reproductivas En Animales Domésticos. Michoacán, pág. 83-120.

Huanca L. W. 2001.Inseminación Artificial A Tiempo Fijo En Vacas Lecheras. Rev. Inv. Vet. Perú. Pág. 161-163.

Irouléguy J. M. 2011. Transferencia de embriones a tiempo fijo: Algunas variables que afectan la tasa de preñez. FCV, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires. Online; <http://engormix.com/articulos/tasa-de-prenez/.htm>Acceso: 26/10/2013.

Jiménez C. 2009.Superovulación: Estrategias, Factores Asociados Y Predicción De La Respuesta Superovulatoria En Bovinos. Facultad de medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia Rev. Med. Vet. Zoot. Vol 56:.pag 195-214

León V. H. 2006. Manual de transferencia de embriones en ganado bovino. pág 26-42

Maldonado E. J., Bolívar G., Paula A. 2008. Racionalidad De Los Esquemas De Superovulación Y Sincronización En La Transferencia De Embriones En Bovinos. Revista Colombiana de Ciencia Pecuaria, Medellín, V21. Online: [Http://Www.Scielo.Org.Co/Scielo.Php](http://Www.Scielo.Org.Co/Scielo.Php) Acceso: 07/11/2013.

Mapletoft R. J. 2013. Bovine Embryo Transfer. Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan. In: International Veterinary Information Service. pág. 1-25. Online: <http://es.scribd.com/doc/Transferencia-Embri-Bovinos>.

Mapletoft R. J. 2013. Bovine Embryo Transfer Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan Canada , IVIS; Online: <http://www.uesc.br/animal/mapletoft.pdf> Pág. 1-25. Ultima actualización 07/02/2013.

Méndez S.E., Ortiz T.J., Landívar M.J. 2006. Evaluación de La Transferencia De Embriones en Razas Cebuinas en Santa Cruz, Facultad de Ciencias Veterinarias, UAGRM. Pág 1-70.

Nivia O. A. 2013. Inseminación Artificial Y Transferencia De Embriones En Bovinos. Unidad II. Escuela De Ciencias Agrícolas Pecuarias Y Del Medio Ambiente. Bogotá. Pág 46-107

Ortiz J. O., López L. & Quezada J. 2001. Manual de Transferencia de Embriones. Santa Cruz - Bolivia Proyecto de Mejoramiento Genético de Ganado de Carne. Pág. 21 – 24

Oyuela A. Jiménez C. 2010. Factores que Afectan la Tasa de Preñez en Programas de Transferencia de Embriones. Revista de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional De Colombia. Pág. 191-200.

Palma G.A. 2001. Introducción En Transferencia de Embriones. Libro; Biotecnología de la Reproducción. 1ra edición. Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria. pág. 85-98 <http://books.google.com.mx/books/biotecnologia> Acceso: 05/11/2013.

Pellerano G. S., Maldonado V.P., Rodríguez S.N., Arzeno, M. T., Crudeli G. A. 2003. Evaluación de Diferentes Protocolos de Superovulación en Búfalos en NEA Argentino. Universidad Nacional De Comunicaciones Científicas Y Tecnológicas. V-042. Pág 1-4.

Ptaszynska M. 2007. Reproducción Bovina. Cap. II. Compendium Reproducción Animal. Investigación desempeño integrado interveter. Pág 15-68

Rivadeneira V. 2013. Ciclo Estral Bovino, Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos, Pág 1-15

Roa N, Denis R., Domínguez A., D'Endel& Marín C. 2013. Creación De Banco de Germoplasma Vacuno (Embriones) De Razas Autóctonas Criollo Limonero Y Siboney Existentes En Venezuela. Mundo Pecuario IX. Pág 129-135,

Rosales T. A., Guzmán S. A. 2008 Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. Sitio argentino de producción animal. Revisión. pag 1-24

Rosell P. R. 2004. Regulación Neuroendocrina Del Ciclo Estral En Los Animales Domésticos. Revista Electrónica De Veterinaria. Universidad De Granma, Cuba. Pág 1-25

Ruiz J., Correa J E., Martínez M. 2010. Vitrificación De Ovocitos Bovinos Y Su Uso En El Desarrollo Partenogénético De Embriones. Arch. Med. Vet. Pág. 79-83.
Salas R. G. 2010. Sincronización de estros en la hembra bovina. EN: Seminario; manejo reproductivo y de nuevas biotecnologías. UMSNH. Pág 77-82. Online: <http://www.vetzoo.umich.mx/biotecnologias.pdf> Acceso; 12/11/2013.

Sartori R., Barros C. 2011. Reproductive Cycles InBosIndicus Cattle. Animal Reproduction Science.24.Pág. 244–250