

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Transferencia de embriones en bovinos.

POR

SEBASTIAN COLOMO LARES.

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE DE 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Transferencia de embriones en bovinos.

POR

SEBASTIAN COLOMO LARES

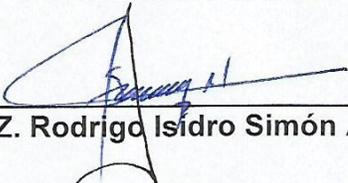
MONOGRAFIA

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

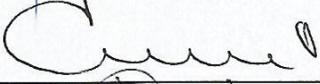
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

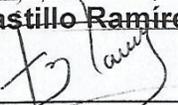
PRESIDENTE:


MVZ. Rodrigo Isidro Simón Alonso.

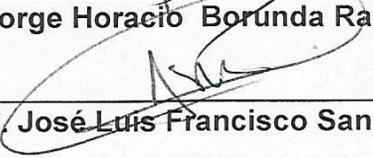
VOCAL:

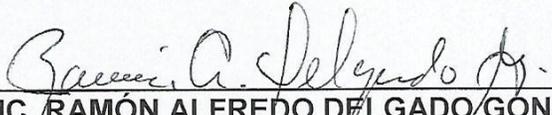

Ing. Martin Castillo Ramirez.

VOCAL:


IZ. Jorge Horacio Borunda Ramos.

VOCAL SUPLENTE:


M.C. José Luis Francisco Sandoval Elías.


MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE DE 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Transferencia de embriones en bovinos.

POR

SEBASTIAN COLOMO LARES

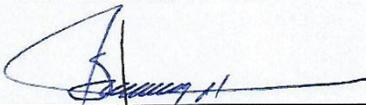
MONOGRAFIA

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

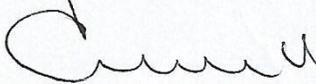
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

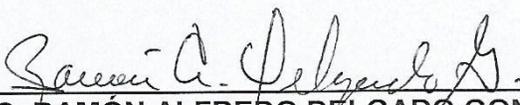
APROBADA POR

ASESOR PRINCIPAL:


MVZ. Rodrigo Isidro Simón Alonso.

ASESOR:


Ing. Martin Castillo Ramirez.


MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal



TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE DE 2015

DEDICATORIA

A mis padres:

Francisco Javier Colomo, por su amor y cariño, por su esfuerzo por sacarme adelante y haberme apoyado a todo lo largo de mi carrera, por sus regaños y consejos que me ayudaron para parte de mi formación, Te quiero.

Ana Laura Lares, principalmente por haberme dado la vida, gracias por poder contar contigo en todo momento eres una persona muy especial en mi vida, de ti aprendí a ser una persona con ideales que no todo en la vida es fácil pero con esfuerzo y dedicación todo se puede lograr, por todas tus palabras de aliento en los momentos difíciles de mi vida, sin ti nada de esto hubiera sido posible. Te amo

A mis hermanos, Daniel, Alejandro, Esteban, Cristina. Que también son mis amigos, por sus palabras de aliento y sus regaños que me sirvieron para seguir adelante a lo largo de mi carrera, por hacerme ver que nada es imposible. Los quiero mucho.

A mis ángeles, José Leonardo, Francisco Javier. Que siempre han estado en mi corazón, que desde el cielo me cuidan y protegen.

A mis abuelos, por todo su amor, bendiciones y consejos que me dieron.

A Alfonso Corral Jiménez por sus palabras de aliento y apoyo incondicional “por hacerme ver que si quieres tener algo tienes que luchar por ello”.

A todas y cada una de las personas que contribuyeron para lograr todo esto.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado la dicha y orgullo de terminar mi carrera profesional, acompañándome en todo momento de mi vida dándome grandes bendiciones en mi vida.

A la **Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”** por abrirme las puertas para mi formación profesional, que representa parte de mi vida y es la fuente primordial de mis conocimientos, siendo orgulloso alumno de la institución

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

Al **MVZ. Rodrigo Simón** gran médico y ejemplo a seguir, por haberme asesorado en este proyecto tan grande para mi formación, gracias por su amistad.

A **mis asesores** por ser parte esencial durante el trabajo de investigación.

A **mis amigos** por su apoyo en todo momento que contribuyeron en parte de mi formación

Índice

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
Resumen.....	V
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes de la transferencia de embriones en bovinos	3
2.1 Fisiología de la reproducción.	3
2.1.1 Comportamiento reproductivo.....	3
2.2 Endocrinología de la reproducción.	4
2.2.1 Hormona.....	4
2.3 Parámetros reproductivos de las vacas.....	6
2.3.1 Estacionalidad reproductiva.	6
2.3.2 Estro.	6
2.3.3 Pro estro.	7
2.3.4 Estro.	8
2.3.5 Metaestro.	8
2.3.6 Diestro.	8
2.3.7 Dinámica folicular ovárica.	9
2.3.8 Luteolisis.	10
2.3.9 Duración del celo.	10
2.4 Historia de la inseminación artificial.....	11
2.4.1 Inseminación artificial.	11
2.4.2 Finalidades	11
2.4.3 Beneficios.....	12
2.5 Temperatura de almacenamiento y procedimientos de descongelado del semen.	12
2.5.1 Control de Temperatura.	12
2.5.2 Procedimiento de Descongelación.....	12
2.6 Lugar de depósito del semen.	13
3 Transferencia de embriones.....	13
3.1 Ventajas de la transferencia de embriones.	14
3.1.1 La transferencia de embriones consta de 4 fases principales.....	14
3.1.2 Gonadotropinas corionica equina (eCG).....	20

3.2 Conservación, protección y Vitrificación de embriones.....	20
3.2.1 Conservación de los embriones.....	20
3.2.2 Crioprotectores.....	21
3.2.3 Vitrificación.....	22
3.3 Congelamiento y descongelamiento de embriones.....	22
3.3.1 Congelamiento de embriones.....	22
3.3.2 Descongelación de embriones.....	23
3.3.3 Aspiración folicular transvaginal.....	24
3.3.4 Grado de clasificación de los embriones.....	24
3.4 Obtención o recolección de embriones.....	25
3.4.1 Métodos para obtención de embriones.....	25
3.5 Sincronía donante - receptora o estadio del embrión y receptora.....	26
3.6 Preparación de materiales para la transferencia.....	27
3.6.1 Cargar las pajillas con los embriones.....	28
3.6.2 Procedimiento de la transferencia del embrión.....	28
CONCLUSION.....	29
Bibliografía.....	30

Índice de tablas

Tabla 1.- Hormonas.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 2.- Hormonas uterinas.....	6

Resumen

La transferencia de embriones es utilizada para el mejoramiento genético en el ganado. Hoy en día con los avances tecnológicos ha sido más factible utilizarse debido a los buenos resultados que se han obtenido.

La transferencia de embriones es utilizada en dos formas tanto en embriones frescos como embriones congelados. Esto consiste en la superovulación de vacas que cuenten con los parámetros genéticos óptimos que el productor dese.

La superovulación consiste en que la vaca seleccionada sea estimulada a base de hormonas para la producción de una mayor cantidad de óvulos para posteriormente ser inseminada y 6 a 8 días después sea agá la colecta de embriones bajo los protocolos correspondientes.

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 de forma simétrica.

Palabras clave: Transferencia de embriones, inseminación, ovulación, superovulación, sincronización.

1 Introducción

La manipulación de los primeros estadios del desarrollo de los mamíferos se inició hace ya 100 años con los trabajadores W.Heap, quien se propuso estudiar en la coneja la importancia del ambiente materno y su influencia sobre el desarrollo de los embriones transferidos (de la Fuente , J. 2001).

La transferencia de embriones se empezó a utilizar como trabajo experimental en 1949 (Cutini *et al.*, 2000). Se ha mencionado a Rowson como el autor principal y fundador de la transferencia de embriones en animales de granja, y la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones reconocido su estatura con el título de Presidente Fundador Honorario (Mapletoft, 2013).

Es una técnica que en un principio tenía como objetivo tan solo el incrementar rápidamente el número de descendientes de aquellas hembras de un alto valor genético (Alcaide, 1990). Dificultades que de distinta índole se presentaron en el desarrollo del método hicieron que el nacimiento del primer ternero se produjera recién en 1964 (Cutini *et al.*, 2000). Durante el siglo XX se lograron grandes avances en reproducción bovina, entre ellos las técnicas de sincronización de calores, inseminación artificial (a celo observado y a tiempo fijo), súper-ovulación y entre ellos la transferencia de embriones (Mogollon, 2005).

En 1987, Smith en la Universidad de Guelph lleva el concepto de la ovulación múltiple y embrión transferencia (MOET). Mostró cómo bien diseñado MOET programas podrían dar lugar a un aumento de la intensidad de selección e intervalos de generación reducido, lo que resulta en una mejora genética ganancias (Mapletoft y Hasler, 2005). En las últimas décadas es la vertiente productiva la que ha proporcionado mayor impulso y desarrollo de las técnicas de manipulación y es sobre todo en el ganado vacuno donde más se han desarrollado y difundido. Gracias a la existencia de programas de mejora genética(de la Fuente , J. 2001 .La industria de la transferencia de embriones de bovino como lo conocemos hoy surgió en América del Norte en la década de 1970 (Mapletoft, 2013).

Hasta el día las técnicas de transferencia embrionaria se encuentra en pleno desarrollo y como vemos más adelante se complementan con otras técnicas laboratoriales tales como la embriocentesis, clonación, sexaje y congelación (Alcaide, 1990).

La transferencia de embriones (TE) en bovinos requiere de la selección y el manejo, tanto físico como farmacológico, de las donadoras y las receptoras, y también de la recolección y transferencia de los embriones dentro de un periodo corto y específico después del estro. Desde el punto de vista metodológico la técnica de la transferencia de embriones(TE) es sencilla en su concepto pero compleja en cuanto a su realización, debido principalmente al gran número de factores que inciden sobre ella y a la necesidad de una serie de pasos precisos y consecutivos, de cada uno de los cuales dependerá el éxito o fracaso de la técnica (de la Fuente , J. 2001).

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 sistémica 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 el uso del estradiol y progestágenos, la hormona liberadora de gonadotropinas(GnRH), o la hormona luteinizante (LH) (Celestinos y Gatica, 2002).

2 Antecedentes de la transferencia de embriones en bovinos.

En resumen, la primer transferencia de embriones de mamíferos fue realizado por Walter Heape en 1890. Heape a transferido dos de cuatro celdas Angora embriones de conejo en una cierva belga inseminadas, que posteriormente dio a luz a cuatro belgas y dos Angora joven (Mapletoft y Hasler, 2005).

No existían reportes de éxito en la transferencia de embriones de mamíferos hasta la década de 1920, cuando varios investigadores descubren de nuevo la transferencia de embriones en conejos. Warwick y sus colegas hicieron considerables trabajo sobre transferencia de embriones en ovejas y cabras en la década de 1930 y de 1940, pero fue Umbaugh, quien informó sobre las primeras transferencias de embriones con éxito en el ganado en 1949 (Mapletoft y Hasler, 2005).

2.1 Fisiología de la reproducción.

2.1.1 Comportamiento reproductivo.

El ciclo estral de la vaca está controlado por la secreción de hormonas del hipotálamo, apófisis, ovarios y útero. Estas son hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH) del hipotálamo, la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) de la hipófisis, estrógeno, progesterona e inhibina de los ovarios y la prostaglandina del útero (Méndez *et al.*, 2006).

El ciclo estral es determinado un una gran serie de eventos fisiológicos que se llevan a cabo en el periodo comprendido de un celo a otro. Ciclo estral tiene una duración promedio de 21 días y puede ser más corto o más largo dependiendo del número de ondas foliculares que se presenten en el ovario del animal (Iñiguez, 2009).

La destrucción del cuerpo lúteo en un bovino no gestante se produce entre los días 16 y 19 de su ciclo estral. El desarrollo folicular ovárico se caracteriza por la presencia de ondas de crecimiento folicular. Una onda ha sido definida como el desarrollo sincrónico de un gran número de folículos, seguido por la secreción y el crecimiento de un folículo dominante y la supresión de folículos subordinados. Durante el ciclo estral se produce el crecimiento de uno o dos folículos dominantes

anovulatorios, previo a la maduración final del folículo ovulatorio (Mendez *et al.*, 2006).

El desarrollo y maduración del folículo preovulatorio provoca un incremento en la secreción de estradiol, el cual causa cambios estrogénicos en el oviducto y útero, comportamiento del celo, y la liberación pre-ovulatoria de FSH y LH. El pico preovulatorio de LH provoca el reinicio de la meiosis, ovulación y luteinización del folículo ovulado para formar el cuerpo hemorrágico. El cuerpo hemorrágico se transforma en cuerpo lúteo y provoca cambios en el oviducto y útero debido a la secreción de progesterona que permitirá el desarrollo embrionario y el establecimiento de la preñez. Si la preñez no ocurre, se destruirá el cuerpo lúteo y comenzará un nuevo ciclo estral (Mendez *et al.*, 2006).

2.2 Endocrinología de la reproducción.

Los eventos reproductivos en los bovinos son regulados por una compleja y solo parcialmente conocida, cascada de actividades combinadas del sistema nervioso central (SNC), cierto número de tejidos secretores, tejidos diana u órgano blanco y diversas hormonas. El SNC recibe información del medio ambiente y del propio animal (señales externas: visuales, auditivas, olfativas, auditivas y táctiles) y la transmite, en la medida que es importante para la reproducción, a las gónadas a través del eje hipotálamo- hipófisis-gónada (Gutierrez, 2008).

2.2.1 Hormona.

La definición básica de hormona es: sustancia fisiológica, orgánica, producida por células especializadas que pasa al torrente circulatorio para su transporte, con el objeto de estimular o inhibir la actividad funcional del órgano o tejido blanco. Muchas hormonas producen una amplia variedad de actividades. Las que controlan los procesos reproducidos se derivan principalmente de ciertas áreas del hipotálamo, hipófisis, gónadas, placenta y útero (Mendez *et al.*, 2006).

Tabla 1.- Hormonas

Hormona	Origen	Función principal
Hormona liberadora	Hipotálamo.	Estimular la secreción de las hormonas de la apófisis. Hay una hormona liberadora para cada hormona producida
	Gonadotropicas.	
FSH	Adenohipofisis.	Desarrollo del folículo y secreción de la hormona estrogenica en hembras.
Luteinizante	Adenohipofisis.	Ovulación y función del cuerpo lúteo en hembras.
Prolactina	Adenohipofisis.	Desarrollo y función de la glándula mamaria.
Oxitocina	Neurohipofisis.	Contracciones uterinas en el parto y excreción de la leche.
Relaxina	Ovario, útero y placenta.	Dilatación del cérvix y relajamiento del conducto obstétrico.
	Gonadales femeninas.	
Estrógeno	Folículo ovárico.	Desarrollo de los órganos genitales y características sexuales secundarias femeninas; celo y preparación endometrial; desarrollo de glándula mamaria.
Progesterona	Cuerpo lúteo	Preparación endometrial ovárica del útero para implantación del embrión y el mantenimiento de preñez. desarrollo de la glándula mamaria.

(Porras y Paramo, 2009).

Tabla 2.- Hormonas uterinas

Uterinas
<p>Prostaglandinas: ácidos grasos no saturados; acción parácrina y endocrina; control de la presión sanguínea, lipólisis, secreciones gástricas, coagulación sanguínea, etc.</p>
<p>FGF2a: liposoluble; uterina; en bovinos atraviesa la vena utero-ovarica a la arteria ovárica, por un mecanismo de contracorriente, es luteolítica, estimula las contracciones uterinas y en el transporte espermático.</p>
<p>PGE2: actúa durante el parto; luteotrófica</p>

(Mendez *et al.*, 2006).

2.3 Parámetros reproductivos de las vacas.

2.3.1 Estacionalidad reproductiva.

Se entiende como un acontecimiento debido a la selección natural y adaptación de los partos a los periodos del año en que las probabilidades de supervivencia son mayores para las crías (Alba, 1964).

2.3.2 Estro.

Esta etapa se entiende como un periodo de actividad y receptividad sexual en donde el signo principal es que el animal se mantiene en pie y quieto al ser montado por otro. También se pueden apreciar, entre otros signos, inquietud, inflamación de la vulva, secreción de moco claro y transparente que sale por la vulva (Rippe, 2009).

La duración de celo es muy variable entre grupos de animales variando entre 30 minutos a más de 30 horas. Los signos de estro ocurren gracias a la presencia de los estrógenos provenientes del folículo. En cierto momento los niveles de estrógenos son lo suficientemente altos en concentración y duración como para inducir los

síntomas de celo o calor, así como para incrementar las contracciones del tracto reproductivo facilitando el transporte del espermatozoides y del ovulo; estos altos niveles de estrógenos afectan también a centros endocrinos en el hipotálamo que controlan la liberación de GnRH del hipotálamo y esta a su vez la liberación de FSH y LH de la adeno-hipófisis (Rippe, 2009).

El celo o estro es el momento ideal, y es aquí donde 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 del celo en la vacas es un alto nivel de estrógeno en sangre y la caída de los niveles de progesterona por lisis del cuerpo lúteo (Becaluba y Becaluba, 2006).

2.3.3 Pro estro.

Este período, tiene una duración es de 3 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación de celo. Al producirse la destrucción del cuerpo lúteo tenemos una caída en los niveles de progesterona y posteriormente una pérdida de tejido luteal, siendo la PGF₂ α de origen uterino el principal luteolítico en los animales domésticos y en la mayoría de los roedores. (Veterinarias, 2005).

Como consecuencia de la caída de los niveles de progesterona, disminuye el feedback negativo que dicha hormona tenía a nivel hipotalámico y comienzan a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotróficas (FSH y LH) y se estimula el crecimiento folicular con el desarrollo de un gran folículo y el aumento en los niveles de estradiol. Cuando los estrógenos alcanzan cierto nivel, se estimula la receptividad al macho y comienza el período de celo o estro (Veterinarias, 2005).

2.3.4 Estro.

El estro dura de 8 a 24 horas, con un promedio de 18 horas. Durante esta fase, la vaca muestra inquietud, ansiedad, brama con frecuencia, disminuye su consumo de alimento y de la producción de leche. El evento más importante es que permanece inmóvil cuando la montan otras vacas mostrando su deseo de permanecer en postura para ser cubierta. En este periodo el folículo o los folículos terminan su maduración preparándose para su posterior ovulación. La ovulación se realizara básicamente se realiza básicamente por efecto de la hormona luteinizante. La vaca se diferencia de casi todos los demás animales domésticos debido al breve período de receptividad sexual, por lo que su no detección puede representar un problema importante. Por otra parte, la conducta de la vaca en estro es tan peculiar que puede identificarse fácilmente en un hato. Durante el estro, aparato genital se encuentra bajo dominio creciente de los estrógenos, lo provoca la secreción de un moco viscoso y cristalino que en muchas ocasiones aparece por la vulva (Bespín *et al.*, 2007).

2.3.5 Metaestro.

El período inmediato a la finalización del celo, es el metaestro (6 días). En este período ocurre la ovulación de la vaca, a diferencia de las otras especies que lo hacen durante el celo, y comienza la organización celular y desarrollo del cuerpo lúteo. La ovulación ocurre 28 a 32 hrs de iniciado el celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH. A la ovulación sigue hemorragia profunda y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en cuerpo hemorrágico. En la formación del cuerpo lúteo (luteinización) se producen una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que permiten que las células foliculares se transformen en células luteales, cambios que finalizan al séptimo día con un cuerpo lúteo funcional (Veterinarias, 2005).

2.3.6 Diestro.

Al quinto día hay un cuerpo lúteo maduro. Las concentraciones en sangre de Progesterona son mayores a 1 ng/ml. El Diestro continúa hasta el día 14. La

Progesterona es responsable de la formación del Endometrio para el establecimiento y mantenimiento de la gestación. Estimula la secreción de sustancias que nutren al embrión hasta que existe la placenta; inhibe las contracciones del útero, el moco cervical se torna más viscoso y cierra el cérvix evitando la entrada de agentes extraños al útero. También estimula en la glándula mamaria la síntesis alveolar y la secreción láctea. Después de 12 días de acción de la Progesterona, en el útero se agotan sus receptores y se vuelve refractario a esta hormona (González, 2000a).

El Estradiol folicular estimula en el útero la formación de receptores Para la Oxitocina y la producción de enzimas Fosfatasa A y Ciclo oxigenasa, indispensables para la síntesis de PGF2 α . De esta forma la Oxitocina producida por el cuerpo lúteo estimulara la secreción de PGF2 α en las glándulas endometriales en forma pulsátil cada 6 a 8 horas. Esto provoca la regresión del cuerpo lúteo y los niveles de Progesterona bajan a menos de 1 ng/ ml terminando el diestro y comenzando el proestro (González, 2000a).

2.3.7 Dinámica folicular ovárica.

Es conocida como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos primordiales que con llevan al desarrollo de un folículo preovulatorio. En Vacas, el desarrollo folicular ocurre en forma de ondas. Usualmente ocurren de 2 a 3 ondas durante cada ciclo estral y el folículo preovulatorio se origina a partir de la última onda. Los ciclos estrales en vacas con 3 ondas foliculares son generalmente más largos (20-24 días) comparados con los ciclos estrales de vacas con 2 ondas foliculares (8-20 días) (Castañeda, 2009).

Mediante el uso de la ultrasonografía ha sido posible confirmar que los folículos bovinos se desarrollan en ondas y que en cada ciclo estral se producen 2 o 3 ondas foliculares. Estas ondas foliculares consisten en que un grupo de folículos antrales inician un crecimiento hasta los 4 mm y a partir de allí se producen una selección de un folículo dominante, que continua con su crecimiento, mientras que los demás folículos se convierten en subordinados e inician su atresia. La emergencia de la

primera onda folicular, sea en ciclos de 2 o 3 ondas, ocurren inmediatamente después de la ovulación, mientras que la segunda onda ocurren entre los días 9 o 10 en ciclos de 2 ondas y en los días 8 o 9 en los ciclos de 3 ondas, con una tercera onda emergiendo en los días 15 y 16 (Ruiz *et al.*, 2006).

2.3.8 Luteolisis.

El cuerpo lúteo es una glándula endocrina transitoria que produce progesterona durante un tiempo determinado por la gestación. Cuando no hay preñez, el cuerpo lúteo sufre un proceso de regresión conocido como luteólisis, el cual divide en funcional, por la pérdida de la capacidad de sintetizar progesterona; y estructural, por la pérdida de integridad celular (Olivera *et al.*, 2007).

La luteólisis es inducida principalmente por la PGF2 α , y de manera secundaria a través de otras rutas paralelas mediadas por calcio, citoquinas, especies reactivas de oxígeno y endotelinas. Todos estos factores conducen finalmente a la inhibición de la esteroidogénesis y/o en la inducción de la apoptosis (Olivera *et al.*, 2007).

2.3.9 Duración del celo.

Los signos de estro o celo ocurren gracias a la presencia de estos estrógenos provenientes del folículo. La duración de celo es muy variable, pero se considera que 16 ± 4 horas es el tiempo promedio. Los estrógenos incrementan, además, las contracciones del tracto reproductivo facilitando el transporte del espermatozoides y del ovulo; y afectan también a centros endocrinos en el hipotálamo que controlan la liberación de GnRH del hipotálamo y ésta, a su vez, la liberación de FSH y LH de la Adenohipofisis (Castañeda, 2009).

El incremento de LH se inicia después de que se hayan iniciado los signos de celo e inicia el proceso de ovulación. En el día 1 el folículo se rompe u ovula, (la ovulación tiene lugar unas 28-32 horas después de haberse iniciado el celo, o a las 10-15 horas de haber cesado los signos de celo en respuesta al pico preovulatorio de LH),

permitiendo la salida del óvulo al infundíbulo que lo espera. Después de la ovulación, las células foliculares se transformarán en células luteales. Durante los próximos cinco o seis días, estas células crecen rápidamente Para formar el cuerpo lúteo, que produce Progesterona, cuya funciones preparar al útero para la gestación e inhibir la liberación de gonadotropinas (Castañeda, 2009).

2.4 Historia de la inseminación artificial.

La inseminación artificial o reproducción artificial se define como el conjunto de técnicas aplicadas por el hombre, con el fin de lograr la fecundación de las hembras sin la intervención directa del macho. La inseminación artificial en las especies domésticas inicia en Italia tras las investigaciones de Lázaro Spallanzani, cuando en 1779 fecunda una perra con material seminal, y logra una camada normal. Sin embargo, con toda justicia, corresponde a Rusia el hecho de haber difundido la inseminación artificial en 1949 (Casillas, 2000).

2.4.1 Inseminación artificial.

La Inseminación Artificial consiste en el depósito de semen en el aparato reproductivo de la hembra mediante una pipeta , procurando hacerlo en el momento en que sea más probable lograr una gestación (Montero, 2003).

La inseminación artificial en la mujer es todo aquel método de reproducción en el que el semen es depositado en la mujer o hembra mediante instrumental especializado y utilizando técnicas que reemplazan a la copulación ya sea en óvulos, en el útero, en el cérvix o en las trompas de Falopio (Cortez, 2011a).

2.4.2 Finalidades

Finalidades de la inseminación artificial son:

- Asegurar la existencia de óvulos disponibles.
- Acercar los espermatozoides al ovulo en el aparato genital femenino.

- Mejorar e incrementar el potencial de fertilidad de los espermatozoides. realizando una serie de procedimientos de laboratorio al eyaculado, llamados en conjunto capacitación espermática (Cortez, 2011b).

2.4.3 Beneficios.

- Disponibilidad de semen de toros probados de cualquier lugar del mundo.
- Control sobre enfermedades de transmisión sexual.
- Se evitan riesgos de lastimar vaquillas al ser servidas con toros de gran peso.
- Se obtienen crías de mejor calidad genética.
- Hay una mejor relación costo beneficio (Figuroa, 2007).

2.5 Temperatura de almacenamiento y procedimientos de descongelado del semen.

2.5.1 Control de Temperatura.

El semen es guardado en un termo con nitrógeno líquido a -160° C de manera adecuada para mantener su preservación. Cuando remueva una pajilla del termo debe tener cuidado de proteger el semen que se mantiene en la unidad (Duarte, 1999).

El semen destinado a utilizarse en la inseminación artificial, es un refrigerador formado por dos paredes de materiales aislantes que utiliza como fuente de frío al nitrógeno líquido (ya que éste se mantiene a una temperatura de -196° C) (Montero, 2003).

2.5.2 Procedimiento de Descongelación.

El semen debe ser descongelado en agua tibia dándole atención cuidadosa al tiempo en que la pajilla permanece dentro del agua y la temperatura de la pistola.

- * Agite la pajilla una o dos veces antes de ponerla en el baño de agua caliente. Esto ayuda a prevenir que el tapón de algodón explote.
- * Descongele las pajillas en agua a 35°C (95°F) en el termo de descongelación con termómetro que se encuentra a su disposición.

- * Colocar la pajilla congelada en el termo de descongelación inmediatamente después de que haya sido sacada del nitrógeno líquido. La pajilla sellada debe sobresalir un poco arriba del nivel de agua.

- * La pajilla debe ser descongelada un mínimo de 45 segundos en el agua a 35°C. Esta puede mantenerse en perfectas condiciones en el agua mientras que usted llega al área en donde va a colocarla en la pistola y a realizar la inseminación. Utilice el semen inmediatamente después de sacarlo del agua.
- * Bajo ninguna circunstancia se debe utilizar semen que ha sido descongelado por más de 15 minutos fuera del agua tibia.(Duarte, 1999).

2.6 Lugar de depósito del semen.

Cuando se hayan pasado todos los anillos de la cérvix, la pistola debe deslizarse libremente hacia adelante. Puesto que la pared uterina es muy delgada, se podrá volver a sentir claramente la punta de la pistola. Ahora estás listo para verificar la ubicación de la punta de la pistola y depositar el semen. Rote su mano izquierda hasta colocarlo encima de la cérvix. Con el dedo índice, ubique la porción delantera de la cérvix. Retire lentamente la pistola hasta sentir la punta bajo del dedo, casi en la mera salida del orificio cervical. Levante tu dedo y lentamente deposite el semen. Empuje el émbolo de la pistola para que el semen se deposite en el cuerpo uterino (Dejarnette y Nebel, 2000).

3 Transferencia de embriones.

La transferencia de embriones es una herramienta para el mejoramiento genético del ganado y 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 pre implantación 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. Esta técnica consiste en un tratamiento hormonal que se aplica a las hembras donadoras para inducir la maduración y ovulación de un gran número de óvulos (superovulacion) (Dominguez *et al.*, 2006).

3.1 Ventajas de la transferencia de embriones.

- Obtención de una descendencia genéticamente superior.
- Disminución del riesgo de contagio de enfermedades infecciosas.
- Mejoramiento genético de un grupo de animales a corto plazo.
- Multiplicación de las características de una hembra genéticamente superior.
- Rescate genético de animales accidentados o enfermos permanentes de los que se pudieran obtener embriones antes de que el animal muera.
- Movimiento nacional e internacional de animales de alto valor genético (importación y exportación).
- Maximiza el uso de material seminal de alto valor.
- Permite hacer una planificación de los cruzamientos.

(Irouléguy, J.2009)

3.1.1 La transferencia de embriones consta de 4 fases principales.

- 1.-Elección del donante.
- 2.- ovulación múltiple o superovulacion.
- 3.- colección de los embriones.
- 4.- transferencia de embriones.

(Romo, 1993).

3.1.1.1 Selección del donante.

Las razones para querer hacer la transferencia de embriones en un animal dado son más a menudo económicas que genética. Como resultados óptimos reducirán los

costos, por lo que el procedimiento mucho más económica, la selección de donantes puede implicar una historia previa de éxito en la transferencia de embriones. Además, se ha sugerido que el potencial animal donante estar en su edad reproductiva de primera, que tiene una historia la fertilidad y que ha demostrado superioridad en características de importancia económica. Los estrictos criterios de selección no sólo se asegurará de superioridad genética, sino que debe también garantizar un alto nivel de éxito con lo que el procedimiento más económico (Mapletoft, 1985).

3.1.1.2 Superovulacion 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 el tratamiento de superovulacion con un promedio de 5 embriones transferibles. El principio básico de la superovulacion es la estimulación del desarrollo folicular a través de una preparación hormonal, que se introduce de una manera intramuscular o subcutánea, con actividad hormonal de estimulación folicular (FSH) (Walenciak y Hereford, 2005).

Se recomienda que un veterinario local palpe las vacas donantes antes del comienzo del FSH, para asegurarse de que tenga un cuerpo lúteo 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 4 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 periodo (Walenciak y Hereford, 2005).

Las vacas con $> 3\text{mg/ml}$ de progesterona al iniciar el tratamiento superovulatorio, tiene más 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 $< 3\text{mg/ml}$ 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 pueden considerar como donadora de mala calidad por supuesto es importante considerar el costo-beneficio y la variabilidad de los resultados (López *et al.*, 1999).

3.1.1.3 Selección de receptoras.

Las vacas receptoras deben ser seleccionadas en el día 7 del ciclo estral. Las vacas deben ser seleccionadas en base a detección de estro 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 (Lopez *et al.*, 1999).

3.1.1.4 Manejo de vacas receptoras.

El manejo de las hembras receptoras hace al éxito o fracaso de la transferencia embrionaria. 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 de embrionaria (Walenciak y Hereford, 2005).

3.1.1.5 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 α (25mg/ml) seguido por la detección del estro. Las vacas detectadas en estro (la mayoría dentro de 48- 96 hrs después de PGF) se programan para recibir un embrión el día 7 del ciclo estral. La transferencia sin la detección de estro pueden también ser realizada usando el programa ovsynch usado típicamente para la inseminación artificial sincronizada. Este procedimiento se sincronización de transferencia de embriones, 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 IM de 100 microgramos de GnRH el día 0 seguido por 25mg 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 se sincronización. Las receptoras sincronizadas con PGF2 α deben ser tratadas entre 12 y 24 horas antes que las donantes, porque el celo inducido por la PGF ocurrirá 60-70 horas en las receptoras, pero entre 36-48 horas después de la PGF en las donantes súper ovuladas. Las tasas de preñez no parecen ser diferentes entre receptora con celo natural y receptoras con el celo inducido con PGF con 11 a 14 días de intervalo y detección por 5- 7 días después de la segunda aplicación de PGF, cuando trabaja con novillonas o vacas secas (Galina y Valencia, 2006)

3.1.1.6 Superovulacion.

La Superovulacion implica el uso de Gonadotropicas hormonas para aumentar rápidamente el número de folículos maduros y sus ovocitos. Este aumento de los folículos maduros conduce a la ovulación más de ovocitos durante un ciclo de estro (hasta 64 ovocitos) que ocurriría normalmente. Actualmente las gonadotropinas

utilizadas incluyen gonadotropina corionica equina (ECG) y la hormona estimulante del folículo (FSH) (Hubbert y Hopkins, 1984).

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 (Lopez, 2005).

Se usa en general en vaquillas y vacas, con algunas variantes como por ejemplo.

- Inyección I de prostaglandinas.
- Detección de celos e inseminación por cinco días.
- Inyección II de prostaglandinas en la mañana del 6 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 superovulatoria, 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 supero ovulacion consiste en controlar durante el crecimiento folicular hormonas que ayuden a el desarrollo de más folículos, y no de uno como es en la mayoría de los casos , el ciclo sexual de la vaca dura 21 días 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 lúteo hemorrágico con caída de los niveles de

estrógenos (etapa del metaestro con una duración de cinco días)continua el predominio del cuerpo lúteo y reposo sexual por la influencia de la progesterona (etapa de diestro que dura 11 días) y al final la regresión del cuerpo lúteo e inicio del desarrollo del nuevo folículo de otro ciclo (etapa del proestro que dura cuatro días) (Rodriguez y Fernandez, 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 manejan son algunos de los factores que influyen sobre la respuesta superovulatoria (Lopez *et al.*, 1999).

El objetivo principal de los tratamientos de superovulación en la 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 superovulatoria, factores individuales y ligados al ambiente. La superovulación se comienza con tratamientos de gonadotropinas entre los días 8 y 10 después que se observan el celo, aproximadamente cuando comienza la segunda onda de crecimiento folicular (Galina y Valencia, 2006).

Las gonadotropinas más utilizadas son extractos de pituitarias porcina y ovina o gonadotropinas corionica 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 de administrar cada 12 h por vía intramuscular. 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 superovulatorio y regularmente presenta celo a las 36- 48 h pos PGF (Galina y Valencia, 2006).

3.1.2 Gonadotropinas corionica equina (eCG).

La eCG administrada algunas horas previas a la ovulación estimula el crecimiento folicular debido a que tiene la capacidad de unirse e incrementar el número de receptores de FSH y LH de los folículos, aumentando el tamaño del folículo preovulatorio, incrementando las concentraciones plasmáticas de progesterona luego de la ovulación, mejorando así el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la preñez (Garnica, 2012).

3.2 Conservación, protección y Vitrificación de embriones.

3.2.1 Conservación de los 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 4grados C permite su conservación por 24 horas, en medio de cultivo. El calentamiento de embriones se realiza a 0.6 grados C por un minuto o bien se colocan directamente a 37 grados 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 o congelación a -196 ° 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, esta 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 sustancia promotoras del

crecimiento que favorecen su desarrollo, absorbe e inhibe metales pesados tóxicos que pueden 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 vitro*. Esto podría deberse a que la misma ofrece resultados aceptables y repetibles en gestación y nacimiento (Kaiser, 2006).

3.2.2 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 crio preservar. Se utilizan crioprotectores permeables como el dimetilsulfoxido (DMSO) o el propanediol (PROH), y no permeables como la sacarosa (Portillo *et al.*, 2006).

Los crioprotectores permeables disminuyen el punto de congelación intracelular y los no permeables favorecen la deshidratación por efecto osmótico. 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 solidificada como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzara 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)

3.2.3 Vitrificación.

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. Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en NL no requiere más de 10 minutos (Celestinos y Gatica, 2002).

Durante el proceso de vitrificación, el embrión está sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante el descongelamiento. Esto se debería a que a medida que desciende la temperatura, se va formando mayor número de cristales de hielo provenientes de agua pura intracelular, y así la concentración del soluto va aumentando en los espacios que aún no se congelan. Este choque osmótico es conocido como “efecto solución”, y puede llegar a ser dañino para la sobrevivencia del embrión, debido a la pérdida del equilibrio de las soluciones intra y extracelulares, respuestas químicas y osmóticas de las células a dichos efectos. Para obtener buenos resultados se deben tomar en cuenta los siguientes factores: volumen de la muestra, concentración de crioprotector, método de adición, temperatura y tiempo de equilibrio, solidificación, tasa de enfriamiento y cambios en el volumen, debido a que estos factores están estrechamente relacionados con la permeabilidad y la toxicidad del crioprotector (Celestinos y Gatica, 2002).

3.3 Congelamiento y descongelamiento de embriones.

3.3.1 Congelamiento de embriones.

El agua es el constituyente principal de los fluidos biológicos, responsable del transporte interno de las sustancias químicas esenciales. El agua pura se congela y forma cristales a 0°C, mientras que esta misma que contiene iones y otras sustancias en solución lo hace a temperaturas más bajas, dependiendo de la concentración de tales sustancias. Conforme el agua de una solución se congela, los cristales de agua pura que se forman van dejando mayores concentraciones

líquidas de aquellas sustancias que están en solución. Este hecho aumenta la presión osmótica del resto del soluto, lo que puede determinar las lesiones de las células (Ordoñez y Guillen, 2006).

Las principales consecuencias físicas y químicas de la congelación son la separación del agua pura de la solución para formar hielo y la mayor concentración de soluto resultante en el líquido residual. Estos hechos y sus efectos sobre las células se hallan influidos por el nivel y los tipos de agentes crioprotectores, por la osmolaridad y el pH del diluyente y por la rapidez de congelación (Ordoñez y Guillen, 2006).

3.3.2 Descongelación de embriones.

El descongelamiento de embriones se realiza en agua a 37 ° C 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 (1m, 0.5 m) y luego se pasan en una placa con PBS. Otra técnica de remoción de 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).

3.3.3 Aspiración folicular transvaginal.

Mejor conocida por sus siglas en inglés, OPU (Ovum Pick-up), la aspiración folicular transvaginal 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. Esta técnica fue aplicada por primera vez en bovinos en 1988 al adaptar para tal fin los procedimientos de búsqueda ultrasonográfica transvaginal utilizados en humanos y aparece como una solución luego de intentos previos de aspiración de folículos en vacas vivas mediante técnicas como la laparotomía y la laparoscopia (Nava y Hernandez, 2000).

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 sonda ultrasonográfica para OPU ha sido construida con la finalidad de que permita la manipulación de la aguja desde el exterior del animal y que el transductor esté en contacto con los ovarios; de ese modo, el extremo de la aguja pueda ser visualizado cuando penetra dentro de los folículos que serán aspirados. 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 (Nava y Hernandez, 2000).

3.3.4 Grado de clasificación de los embriones.

G I: Excelente, el desarrollo corresponde al día de la recolección. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniformes, simétricos, de forma esferoide y la zona pelucida está intacta.

G II: Bueno, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares. Su forma puede ser ligeramente irregular.

G III: Regular, el embrión posee varios defectos: detritus celular, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelucida.

G IV: Malo, el embrión posee muchos defectos: los correspondientes al G III más desarrollo retardado, seria ruptura de la zona pelucida -el embrión puede encontrarse parcialmente fuera de ella-, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o vacuolización de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y la clara degeneración. Esta categoría es considerada como no transferible (Palma, 1999a).

3.4 Obtención o recolección de embriones.

Los embriones bovinos empiezan a descender hasta el útero alrededor del día 4-5 (estro=día 0) y salir de su zona pelucida entre los días 8 a 10. Consecuentemente, la mayoría de las recolecciones no quirúrgicas deberán hacerse entre los días 6 a 8. Los embriones bovinos, destinados a un programa de TE pueden ser obtenidos del útero por medios no quirúrgicos. Su recolección y transferencia con éxito dependen de varios factores. En primer lugar de la resistencia de éstos para sobrevivir y llegar a término después de ser recolectados del tracto genital, evaluados *in vitro* y transferidos a un genital receptor, con cambios de medio y temperatura. En segundo lugar depende de que la técnica de obtención no ponga en peligro la integridad del tracto genital, a fin de poder repetirla tantas veces como sea deseable y conveniente (Palma, 1999b).

3.4.1 Métodos para obtención de embriones.

3.4.1.1 Métodos no quirúrgicos para obtención de embriones.

Los embriones bovinos pueden ser recolectados no quirúrgicamente con diferentes modelos de catéteres, como el catéter de Foley, Rush Catéter, IMV catéter, y el catéter Rugofer. Las Sondas de Foley de dos vías (Francesa tamaños N° 16 a 24) con un balón inflable de 5ml son usadas normalmente; el catéter de dos vías posee un canal para inflar el balón más un canal simple para la entrada y Salida del medio de lavado. Un estilete estéril (como el usado en la pistola de I.A.) Se inserta a todo lo

largo de la sonda con el fin de tornarla lo suficientemente rígida, para ser introducida en el útero, guiándola con la mano a través del recto. La donadora debe trabajarse en un brete; a animales nerviosos se les puede aplicar de 5 a 10mg de cloropromazina o xilazina (0,1 mg/kg). Las heces son cuidadosamente removidas para evitar la aspiración de aire. Se efectúa entonces un estimado previo del número de ovulaciones (CL) (Gonzalez, 2000b).

3.4.1.2 Método quirúrgico.

La primera técnica de recolección de embriones bovinos usada hace aproximadamente dos décadas, fue quirúrgica. La misma requería anestesia general, inducida por medio de barbitúricos y mantenida por medio de inhalación (halotano). Por medio de una incisión de 15 cm de longitud en la línea media, por delante de la glándula mamaria, se extraían los cuernos uterinos con los ovarios (Palma, 1999b).

El lavaje de los cuernos y oviductos se llevaba a cabo el día 5-7 introduciendo catéteres de goma a través de la pared dorsal del cuerno uterino y en la ampolla del oviducto. Cada cuerno era lavado con volúmenes variables de 40-60 ml de una solución buffer (M 199). La manipulación quirúrgica del útero y de los ovarios conduce a lesiones que provocan formación de fibrina y adherencias. Para minimizar ese efecto fue necesario trabajar con buenas condiciones de asepsia, lavando el útero y los órganos adyacentes con solución fisiológica estéril, conteniendo heparina, lo que constituye una seria limitante en el uso repetido de esta técnica. La tasa de éxito varió entre 50 y 70% de embriones y ovocitos obtenidos, en función del número de cuerpos lúteos presentes (Palma, 1999b).

3.5 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,. 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 (Galina y Valencia, 2006).

La utilización de vaquillas como receptoras frente a vacas ofrece superiores tasas de gestación, mayor facilidad de manejo por su uniformidad y menor coste. Deben ser seleccionadas aquellas vaquillas que ciclen normalmente y hayan alcanzado un 45-55% de su peso adulto, con un buen desarrollo y condición corporal (de la Fuente , J. 2001).

3.6 Preparación de materiales para la transferencia.

Todos y cada uno de los materiales a utilizarse deberán ser esterilizados, en primer lugar, ser lavados con un detergente no tóxico, enjuagados muy bien con agua destilada, secados y posteriormente envueltos para su esterilización. Se dispone de un número de métodos para la esterilización, y la selección de éstos depende generalmente de la naturaleza del material que será esterilizado: (Stringfellow, 2000).

1) Calor seco: Los materiales que no son dañados por altas temperaturas podrán esterilizarse dejándolos durante 2 horas a 160°C (Stringfellow, 2000).

2) Calor húmedo: (Esterilización al vapor). Deberá mantenerse una temperatura de 121°C y una presión de 104 kilo pascal por lo menos durante 30 minutos (6). A tal efecto pueden conseguirse indicadores que se colocan en/sobre el envase y que cambian de color cuando la esterilización se lleva a cabo adecuadamente. Los materiales a esterilizar deben ser envueltos en gasa o en otro material que permita que el vapor penetre y que más tarde permanezca impermeable a los microorganismos (Stringfellow, 2000).

Antisépticos: Como por ejemplo el alcohol (70-90%) que es utilizado a menudo para desinfectar las superficies de los materiales. Será necesario ventilarlos un tiempo suficiente para permitir la evaporación del alcohol (Stringfellow, 2000).

3.6.1 Cargar las pajillas con los embriones.

- Usar jeringas de 1 mL desechables para llenar pajillas.
- Primero llenar la pajilla con etilenglicol, luego dejar un espacio de aire, seguido de etilenglicol o glicerol con el embrión (el embrión queda en la parte media de la pajilla), llenar de nuevo un espacio de aire y por último llenar con etilenglicol o glicerol.
- El espacio de aire sirve de ayuda al momento cuando se transfiere el embrión a que no quede adherido en la pajilla o en la punta de la pajilla y salga todo el contenido (Orellano, 2007).

3.6.2 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 pueden lograr por el técnico (empujando el brazo en el recto hacia abajo y detrás levemente) o por 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).

CONCLUSION

La transferencia de embriones en bovinos, tiene su grado de complejidad, pero llevándose un buen manejo reproductivo su eficacia puede llegar a alcanzar un buen porcentaje de preñez.

Si no se lleva un buen manejo en los animales puede haber factores externos o internos como enfermedades u otras anomalías en el cual el animal se puede ver afectado u el embrión.

Bibliografía

- Alba, J. 1964. "Reproduccion y genética animal "Rev. Agropecuaria sic: 80
- Alcaide, M. 1990. "Trasferencia embrinaria: realidad, presente y futuro." Mundo Ganadero 3: 35.39.
- Becaluba, H. y F. Becaluba 2006. "Nuevas tecnologías para el manejo de la deteccion del celo " sitio Argentino de produccion animal: 1-4.
- Bespin, A., I. Rivero y A. Morgado 2007. "Historia y uso de la inseminacion artificial en la Agropecuaria "la fundacion", Estado Guarico " 2: 154
- Casillas, O. 2000. "Inseminacion artificial de ganado bovino." Fundación produce Sinaloa, SAGARPA, Gobierno del estado de Coahuila. Memoria de capacitación MC: 9.
- Castañeda, L. 2009. "Fisiología de la reproducción bovina " universidad de la Salle 36.tesis: 29.
- Celestinos, M. y R. Gatica 2002. "Vitrificacion Como Tecnicna de crioconservacion de embriones bovinos " Instituto de Reproducción Animal 2.Arch, Med.vet: 157-160.
- Cortez, R. 2011. "Comparación del uso de la biotecnología reproductiva entre humanos y bovinos " Universidad Veracruzana, facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Tesis 1: 1 -49.
- Cutini, A., M. Teruel y J. Cabodevila 2000. "Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirurgica de embriones bovinos." Revista Taurus 7: 28-39.
- Dejarnette, M. y R. Nebel 2000. "Inseminación artificial en bovinos " select reproductive solutions.Rev, Select. Sires 1-4.
- de la Fuente , J. 2001. "Transferencia de embriones en ganado bovino." Reproducción Bovina. Libro: Reproducción bovina: 375-387.
- Dominguez, O., J. Orantes y W. Esponda 2006. "Manual de transferencia de embriones " Universidad Autonoma de Chiapas 1-2.
- Duarte, A. 1999. "Manual de inseminación artificial de ganado " sitio argentino de produccion animal 1: 1-53.
- Ellen Marelló, B., B. Borrero, C. Zuluaga y M. Jimenez 1996. "Primer taller de criopreservación de embriones. Reporte 1-2".
- Figuroa, F. 2007. "Manual de inseminación artificial " alta genetics de Mexico 4-5.
- Galina, C. y J. Valencia 2006. "Reproduccion de animales domesticos 2a ED Mexico:limusa."
- Garnica, P. 2012. ""Efecto de la gonadotropina corionica equina(eCG) en la ovulacion con protocolos de iatf en vacas holstein posparto"." tesis 1: 17.
- Gibbons, A. y I.Cueto 1995. "Transferencia de embriones en ovinos y caprinos " Centro Regional Patagonia 2 Tesis: 32.
- Glauber, C. 2007. "Manejo reproductivo en el rodeo bovino lechero: Propuestas y reflexiones " sitio buenos Aires Argentina: 1-5
- Gonzalez, G. 2000a. "Reproduccion." VIRBAC salud animal 15: 1-8.
- Gonzalez, R. 2000b. "Procedimiento en los programas de transplante de embriones en ganado bovino. "Libro: Reproducción bovina 25: 392-395.
- Gutierrez, J. 2008. "Hormonas de la reproducción bovina " libro: Desarrollo sostenible de ganadería doble proposito 42: 516 - 530.

- Hubbert, K. y S. Hopkins 1984. "Bovine Embryo Transfer-Present and Future "libro". Iowa State Veterinarian 46,issue 2: 113.
- Iñiguez, F. 2009. "Manipulación del ciclo estral en ganado bovino " laboratorio virbac mexico 23: 2-4.
- Irouléguy, J.2009. "Transferencia de embriones frescos a tiempo fijo: algunas variables que afectan la tasa de preñez." Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires 1 sitio argentino.
- Kaiser, G. A., F. Mucci,N. Hozbor,F. 2006. "criopreservacion de embriones de bovinos.Area de obstetricia." Fac.Cs.Vet 7: 1-11.
- Lopez, D. 2005. "Sincronización de celos, sexado de semen, transferencia de embriones: por que y para que en un sistema de crias. Aspectos claves.Jornada de Actualizacion Tecnica Ganadera Ganaderia con precision.Region de Centro de AACREA, CREA " tesis 1: 1-6.
- Lopez, J., A. Gamoba y A. Garcia 1999. "Concentración plasmática de progesterona y produccion embrionaria, en vacas superovuladas bajo condiciones tropicales " Vet.Mex 30: 19-23.
- Mapletoft, R. 1985. "Embryo transfer in the cow: general procedures " Rev.sci.teach.Off.int Epiz 4: 846-847.
- Mapletoft, R. y J. Hasler 2005a. "Assisted reproductive technologies in cattle: a review." Rev.sci.teach.Off.int Epiz 24: 393-403.
- Mapletoft, R. 2013. "History and perspectives on bovine embryo transfer." Journal Animals Reproductions 3: 168-173.
- Mendez, S., T. Ortiz y M. landivar 2006. "evaluación de la transferencia de embriones en las razas cebuinas en santa cruz,." facultad de ciencias veterinarias, UAGRM. 1: 1-73.
- Mogollon, E. 2005. "Sexado de embriones bovinos." Journal Spei Domus 1: 28-33.
- Montero, J. 2003. "Manual de inseminación artificial en bovinos." Tesis 1: 1-54.
- Nava, H. y H. Hernandez 2000. "Aspiracion folicular transvaginal " Programa de Reproduccion Bovina 612-61.
- Olivera, M., A. Tarazona, T. Ruiz y G. Murillo 2007. "vias implicadas en la luteolisis bovina " dialnet 20: 387-393.
- Orellano, J., E. Peralta 2007 "Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International and Sexting Technologies. Tesis 1 : 32
- Ordoñez, J. y H. Guillen 2006. "Manual de Transferencia de Embriones en el Ganado Bovino " Tesis 1: 10-13.
- Palma, G. 1993a. "Evaluacion Morfologica de los embriones " libro, Transferencia de embriones y biotecnologías de la reproducción en la especie bovino: 80.
- Palma, G. 1993b. "Recoleccion de los embriones " libro, Transferencia de embriones y biotecnologías de la reproducción en la especie bovino 58.
- Porras, A. y R. Paramo 2009. "Manual de prácticas de reproducción animal " facultad de medicina veterinaria y zootecnia.: 1-246.
- Portillo, L., M. Madero y C. Bacter 2006. "Fundamentos de criopreservación." Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologia 57: 291-300.
- Quintela, L., J. Becerra y G. Herradon 1999. "Influencia del dia de inicio del tratamiento en los resultados de superovulacion en vacas lecheras " Arch. Zootecnia 48: 43-50.

- Rippe, c. 2009. "el ciclo estral." Dairy cattle reproduction conference 111-116.
- Rivera, R. y J. Hansen 2007. "Preparacion de embriones producidos in vitro para transferir a receptoras,Florida." 23-25.
- Rodriguez, B. y C. Fernandez 2001. "La transferencia de embriones.Una tecnica de mejormiento animal en ganado de lidia " Cir.Ciruj 69: 129-134.
- Romo, S. 1993. "Biotecnologia reproductiva: Avances en ganando bovino." vet.mex: 177.
- Ruiz, H., H. Leon, A. Ruiz y A. Villalobos 2006 "Manual de Inseminacion Artificial en el Ganado Bovino " 1: 10.
- Stringfellow, D. S, Seidel. 2000 "Recomendaciones para la manipulaci3n Sanitaria de embriones". Manual de la sociedad Internacional de Transferencia de Embriones 3 Ed: 230
- Veterinarias, I. d. e. 2005. "Fisiologia reproductiva del bovino " sintex 1: 1-4
- Walenciak, D. y B. Hereford 2005. "Hechos sobre transferencia de embrionaria:ya no hay m3s l3mites "sitio Argentino de producci3n animal. 72: 48-58.