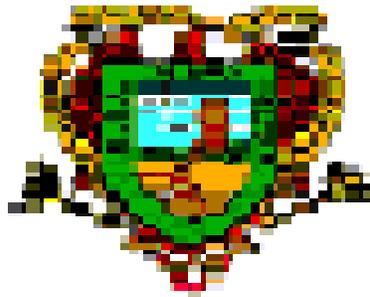


UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCION



TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN GANADO OVINO

por

ROEL CRUZ MACIAS

MONOGRAFÍA

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Buena vista, Saltillo, Coahuila, México  
Mayo, 2003

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN GANADO OVINO

por

ROEL CRUZ MACIAS

**Que somete a la consideración del H. Jurado calificador como  
Requisito Parcial para obtener el título de:**

**INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

Aprobado por:

Presidente: M.V.Z. JOSE ANTONIO GALLARDOS MALTOS

Sinodal: Q.F.B. LAURA PADILLA GONZALES

Sinodal: M.V.Z. JOSE LUIS BERLANGA FLORES

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

ING. RODOLFO PEÑA ORANDAY

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Mayo, 2003

Dedicatoria:

A mis padres:

Bella Doris Macías López

Enrique Cruz Ramos

Por haber contribuido en mi formación personal y de poder darme la vida, así como el apoyo moral y económico que me brindaron.

Hermanos: Raul

Leonel

Amir

Por el haberme dado sus cariño y apoyo en realizarme como profesionista.

A mi novia:

Norma Deli

Por su gran perseverancia de estar a mi lado siempre, a si como su apoyo que me brindó incondicionalmente.

A mis amigos: Mario, José Antonio, Silverio, Bernardo, Julio.

Por su gran amistad y su colaboración en el desarrollo profesional.

## Agradecimientos:

Manifiesto mis mas sincero agradecimientos a todos a aquellas personas que me brindaron su apoyo incondicional para realizar este trabajo.

En especial al, M.V. Z. JOSE ANTONIO GALLARDO MALTOS por su gran interés y valiosa colaboración en la realización del trabajo, así como de contribuir en mi formación profesional.

De la misma manera agradezco también al M. V. Z. JOSE LUIS BERLANGA FLORES, por proporcionarme su apoyo en el trabajo, además de proporcionarme su tiempo y experiencia en mi formación profesional.

Manifiesto también es especial a la Q. F. B. LAURA PADILLA GONZÁLES por su colaboración en revisión del trabajo, así como su amistad brindada.

INDICE	Pag.
Tablas-----	vii
Figuras-----	viii
I. INTRODUCCIÓN	
Antecedentes-----	2
Objetivo-----	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA-----	
Anatomía del aparato reproductor de la oveja-----	4
Pubertad-----	5
Ciclo estral de la oveja-----	5
Endocrinología del ciclo estral-----	7
Etología-----	8
Estación reproductiva-----	8
Selección de animales donantes-----	10
Manejo y preparación-----	11
Superovulación-----	12
Superovulación con PMSG-----	12
Superovulación con FSH-----	13
Superovulación con FSH+LH-----	15
Receptoras de embriones-----	16
Selección-----	16
Sincronización de celos-----	16
Métodos de progestágenos y aplicación-----	18
Esponjas con progestágenos-----	18
Colocación y retiro de las esponjas-----	20
Método de las prostaglandinas y aplicación-----	20
Sincronización donadora-receptora-----	22
Inseminación-----	24
Inseminación vaginal-----	25

Inseminación cervical-----	25
Inseminación intrauterina-----	27
Métodos de Recuperación de embriones-----	30
Preparación pre-operativa de la oveja-----	30
Laparotomía-----	31
Laparoscopia-----	35
Manipulación y evaluación de embriones-----	36
Micromanipulación y aislamiento-----	37
Crioconservación-----	38
Almacenamiento a corto plazo-----	38
Almacenamiento a largo plazo-----	39
Medio de lavado-----	39
Características del medio de lavado-----	40
Criterios para la evaluación de embriones-----	41
Clasificación de embriones de acuerdo a su calidad-----	43
Descripción de estadios de desarrollo del embrión-----	44
Transferencia del embrión-----	45
Medidas de higiene antes de la transferencia-----	46
Métodos de transferencia-----	46
Laparotomía-----	46
Laparoscopia-----	47
Factores que afectan el resultado de transferencia de embriones-----	51
Ventajas y desventajas de la transferencia de embriones-----	54
Preñez y porcentajes de partos-----	54
III. CONCLUSIONES-----	56
IV. LITERATURA CITADA-----	57

INDICE DE TABLAS.	PAG.
Tabla 1: Mes de inicio y terminación de la época de presentación de celos de la oveja en México. -----	9
Tabla 2: Dosis de gonadotropinas para superovulación en la oveja. -----	14
Tabla 3: Protocolo de superovulación en donadoras.-----	15
Tabla 4: Resultados de los diferentes métodos de inseminación con semen fresco y congelado.-----	29
Tabla 5: Etapas de desarrollo embrionario en la oveja.-----	42
Tabla 6: Efecto de la etapa de desarrollo de embriones sobre la supervivencia después de transferidos.-----	51
Tabla 7: Promedios esperados en un programa de transferencia de embriones.-----	51

INDICE DE FIGURAS.	PAG.
Figura 1: Cambios hormonales en el ciclo estral de la oveja.-----	8
Figura 2: Aplicación de esponjas con progesterona -----	21
Figura 3: Técnica de inseminación vía intra-cervical-----	26
Figura 4: Técnica de inseminación artificial vía laparoscopia-----	28
Figura 5.: Posición pre-operatoria de la oveja -----	31
Figura 6: Extracción de los cuernos uterinos a través de una laparotomía media-----	32
Figura 7: Técnicas quirúrgicas de recuperación de embriones.-----	34
Figura 8: Lavados a través de catéter.-----	35
Figura 9: Recuperación de embriones con la ayuda de una laparoscopia.----	37
Figura 10: Morfología de desarrollo de acuerdo a la edad embrionaria a partir de la primera inseminación.-----	45
Figura 11: Técnica de transferencia vía laparoscopia.-----	48
Figura 12: Deposición del embrión.-----	49

## I. INTRODUCCION

La ganadería, como cualquier otra empresa, requiere del mejoramiento constante de sus productos. En este caso, el avance que se puede tener de la calidad genética de los animales proporciona al ganadero buenos dividendos, a mediano plazo.

Para aumentar la calidad de su producción, el ganadero cuenta en la actualidad con algunas herramientas que pueden ayudarla a aligerar el proceso de mejoramiento de su animales, y una de las mas modernas en este ámbito es el de Transferencia de embriones. Esta biotecnología, consiste en un conjunto de técnicas que permiten producir, recuperar y transferir embriones, generalmente el éxito se mide en gestaciones y/o crías producidas, dependiendo de que tan bien se realice cada una de estas técnicas; dentro de estas están: selección de donadoras, de receptoras, recuperación y evaluación de embriones y finalmente la transferencia.

El procedimiento de la Transferencia de Embriones inicia pues, con la selección del hato. En la selección de donadoras se recomienda tomar en cuenta la superioridad genética, habilidad reproductiva y valor comercial. Estas tres características de selección sin embargo, aun siendo determinantes no son los únicos, en nuestro medio, son importantes también otras características tales, como resistencia al calor, enfermedades, condiciones ambientales adversas, etc.

La transferencia de embriones es una técnica compuesta que requiere experiencia y cuidado en muchas áreas, se emplea tanto por criadores cuya mayor actividad e ingresos depende exclusivamente de la cría de animales, como por los que crían animales como capricho, inversión o especulación. Esta tecnología es costosa y supone un considerable riesgo financiero. Es por esto que su principal aplicación es de un pequeño grupo de animales, para la posterior promoción y comercialización de individuos con un considerable valor económico.

Bajo condiciones naturales de reproducción, de una oveja podemos obtener dos o hasta tres crías por año, con la Transferencia de embriones es posible obtener de seis a ocho crías por año con tres o cuatro padres diferentes en igual

número de programas de Transferencia de Embriones. Esta tecnología se ha aplicado muy extensamente en bovinos; como consecuencia, la tecnología ha avanzado con mas rapidez en esta especie. Así pues, el valor de la transferencia de embriones en bovinos ha probado su gran eficacia en corto tiempo en programas reproductivo, y para que tenga el mismo tipo de impacto en la mayoría de los productores, aun se requiere de perfeccionamiento y mayor información en diversas fases del proceso. No obstante el potencial de ésta técnica ha captado el entusiasmo y la imaginación de los ganaderos de otras especies, como en pequeños rumiantes.

### **Antecedentes**

Los primeros intentos fueron enfocados más hacia la experimentación que hacia la práctica en animales pequeños, en la que se realizaban exitosas transferencias de embriones en conejos, (Beidl, y col., 1922), en ratas (Nicholas, 1933), citados por (Derivaux, 1976).

Warwick y Berry, (1949), realizaron los primeros ensayos con resultados exitosos en ovejas y cabras, luego dos años después se transfieren embriones en cerdos (Kvansnickii, 1951); en ganado bovino (Willett, y col., 1951); después Marden y Chang,( 1952) realizan el primer envío intercontinental de embriones de conejos, almacenados a 10°C, citados por (Healey, 2002).

En 1971, se forma la primera compañía comercial para la transferencia de embriones en animales de granja realizado por Transplante de Ganado de Alberta, Ltd., esto en ganado bovino; un año después se obtienen proles de embriones congelados a largo plazo en ratas, (Whittingham, y col., 1972); Wilmut y Rowson, (1973) realizan ensayos en ganado bovino, y obtienen descendencia a través de embriones congelados, y además en ese mismo año se forma la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, citados por (Kunkel, 1992).

Steptoe y Edwards, (1978), citado por (Healey, 2002.) obtienen el primer nacimiento de una bebé después de una transferencia embrionaria, en humanos. En este mismo año es importante sobre todo para México, pues se introduce la técnica de Transferencia de embriones en nuestro país.

En 1979 se obtiene el record de terneros concebibles por vaca de la raza simental y en 1980 nace en México la primera cría, engendrada a partir de una transferencia embrionaria en ganado Gyr, posteriormente en 1982 se realiza la primera transferencia a nivel comercial, (Gonzáles, 1985).

Hasta el momento el mayor logro obtenido con transferencia de embriones es sin duda, el incremento del índice de reproducción de bovinos genéticamente superiores, ya que de esta forma regularmente se obtienen mayores crías por animales (Derivaux, 1976).

Resultados similares, aunque en menor escala, se han obtenido en ovejas, cabras, cerdas, conejas y en menor grado en yeguas (McDonald, 1986).

Históricamente la tecnología en transferencia de embriones cumple 113 años en nuestros días. Como resultados de varias líneas de investigación, principalmente en los Estados Unidos y Europa, y especialmente en los últimos 33 años, la tecnología de transferencia de embriones ha pasado de las condiciones controladas de laboratorio a una fase de validación a nivel de campo en que se encuentra (Zapien, 1990).

La información disponible indica que actualmente en los Estados Unidos se realizan mas de 100,000 transferencias por año y en Europa mas de 40,000.

## **Objetivos**

Dar a conocer la información más actualizada sobre transferencia de embriones en ovinos a estudiantes, profesionistas e interesados en el área de reproducción y genética animal.

## II. REVISION DE LITERATURA.

### **Anatomía del aparato reproductor de la oveja.**

Las partes que constituyen el aparato reproductor son:

- Vulva
- Vagina
- Oviducto
- Ovario
- Cerviz
- Útero

Los ovarios, son órganos pares suspendidos en la región sublumbar caudalmente a los riñones en la cavidad abdominal. Son de consistencia firme y tiene funciones exocrinas y endocrinas. El ovario de la oveja tiene una forma y del tamaño de una avellana con un peso de 8 gr cada uno. El Oviducto, es un tubo muscular pequeño, su abertura cerca del ovario tiene forma de embudo conocido como infundíbulo, el cuál se continua con el ámpula y finalmente con el istmo uniéndose a la cavidad uterina en la entrada uterina o unión útero-tubárica. Y es en la unión istmico-ampular donde se da la fecundación del óvulo. El oviducto tiene una longitud de 15 cm aproximadamente. El útero, de la oveja posee un cuerpo y dos cuernos (bicorne), en la que consta de un cuerpo verdadero corto de 3-5 cm de largo, que se continua en dirección al oviducto por regiones también cortas fusionadas exteriormente. En este órgano se localiza el feto en la oveja preñada; además permite el paso de los espermatozoides y del óvulo al sitio de fusión de gametos. El útero tiene una longitud de 9-16 cm (De Alba, 1985)

Cuello o cérvix, es el órgano que separa el útero de la vagina protegiéndolo del contacto externo a excepción al momento del parto y el periodo de celo; este tiene una forma arqueada en forma de S. Tiene una longitud de 7 cm; su pared tiene una serie de crestas y oquedades que cuando están fijas entre sí, hacen impasable el cerviz, los pliegues cervicales se fijan tan estrechamente que solo dejan un paso muy pequeño y tortuoso, paso que es prácticamente impenetrable por la pipeta de inseminar. Vagina, ésta es ancha y relativamente larga, es un

órgano fibromuscular de pared gruesa que se extiende desde el cerviz hasta la vulva. En la monta natural, el semen es depositado en la parte craneal de la vagina. Contienen glándulas secretoras productoras de moco para su lubricación en el periodo de celo. La vulva. Parte terminal del aparato sexual femenino; está formado por una hendidura de 3 cm de longitud. Lo constituyen los labios vulvares, izquierdo y derecho, los cuales se unen en las comisuras ventral y dorsal, también representa el final del aparato urinario ya que la uretra se abre en el piso de la vulva (Zarate, 2000).

### **Pubertad**

Zarate, (2000) cita que en la oveja la pubertad, es cuando se presenta el primer celo. Esto está asociado con la ovulación. Se presenta entre los 4 y 12 meses de edad, dependiendo de la raza, época de nacimiento, la alimentación y el sexo. Las razas como la Finnsheep y la Polypay se maduran primero, mientras que la Rambouillet se madura sexualmente después de otras razas.

Galina, y col., (1988), además indica que los animales que nacen al inicio de la primavera pueden presentar ciclos estrales y concebir entre 5 y 7 meses de edad (otoño del mismo año); mientras las nacidas al final de la primavera ciclan hasta la edad de los 16 meses (otoño del año siguiente).

Según Pineda y Del campo, (1970) el primer estro se presenta entre los 4-10 meses de edad ; la estación del año es un factor muy importante en el establecimiento de la pubertad, y para ello las considerables variaciones. También, la edad de pubertad es una característica que pasa genéticamente. Las crías de ovejas que llegaron a la pubertad joven tienen más probabilidad a madurarse sexualmente temprano también.

### **Ciclo estral de la oveja**

Su ciclo estral es de alrededor de 17 días en promedio, con una fase luteal de 14-15 días y de fase folicular en 2-3 días. El día 0 del ciclo inicia la ovulación, la liberación de un folículo maduro, que contienen el huevo. Durante la fase luteal, las rupturas del folículo se transforman en un Cuerpo Lúteo, que es la que produce

la progesterona, la hormona que prepara el útero para la implantación y que mantiene la preñez temprana en la oveja. Si no ocurre la preñez, el CL regresa, debido a una hormona (la prostaglandina), producida por el útero no preñado y el comienzo del ciclo nuevo (Schoenian, 1999).

El ciclo estral consiste de varias etapas o fases:

- ❖ Proestro o crecimiento folicular previo a la receptividad sexual, regresión del cuerpo lúteo, y su duración es de dos días.
- ❖ Estro o etapa de la receptividad sexual, su duración es de uno a dos días.
- ❖ Metaestro o etapa donde se inicia con la ovulación y termina cuando el cuerpo lúteo alcanza su plena funcionalidad, es decir, etapa de la maduración del cuerpo hemorrágico, su duración es de dos días.
- ❖ Diestro o etapa, cuando el cuerpo lúteo alcanza su plena funcionalidad, mismo que secreta las más altas cantidades de progesterona, su duración es de 11 a 12 días (Zarate, 2000).

El ganado doméstico exhibe periodos cortos y aislados de actividad sexual (receptividad) que ocurre muy cerca del momento de la ovulación. La oveja es receptiva al carnero por solo 24-36 horas. Uno de las claves para un programa de inseminación acertada es saber cuando inseminar a la hembra. En casi todas las especies mamíferas es crítico inseminar antes de la ovulación. La oveja ovula aproximadamente 48 horas después del inicio del calor. Desafortunadamente es muy difícil detectar el calor en la oveja. Las muestras visuales del calor, presentadas en otros animales domésticos no es observada en la oveja. Un carnero vasectomizado se puede utilizar para detectar el celo, pero es más práctico utilizar hormonas sintéticas para manipular el ciclo reproductivo de la oveja de tal manera que todas las ovejas entren en calor acertadamente y poder inseminarlas en sincronía (Schoenian, 1999).

La duración del estro en las ovejas varía en un rango de 18-72 horas pero sucede ser más corto si las hembras están en contacto continuo con machos. En

ovejas de raza merino el estro dura entre 24-42 horas y en ovejas vírgenes de 24-32 horas (De Alba, 1985).

### **Endocrinología del ciclo estral**

En la oveja, existe una relación inversa entre los niveles medios de la LH y la progesterona; los niveles mas altos de LH se observa en las fases inicial y final del ciclo estral y las mas bajas durante la fase media (Pijoan, 1983). Es decir su pico en el plasma aparece entre 5 y 12 horas después del inicio del estro y alcanza niveles de 20 a 100 ng/ml, y su nivel permanece bajo en otras fases del ciclo en la que el nivel de progesterona es de aproximadamente de 2 a 4 ng/ml y se eleva cuando la progesterona plasmática alcanza un nivel inferior a 1 ng/ml (Galina, y col., 1988).

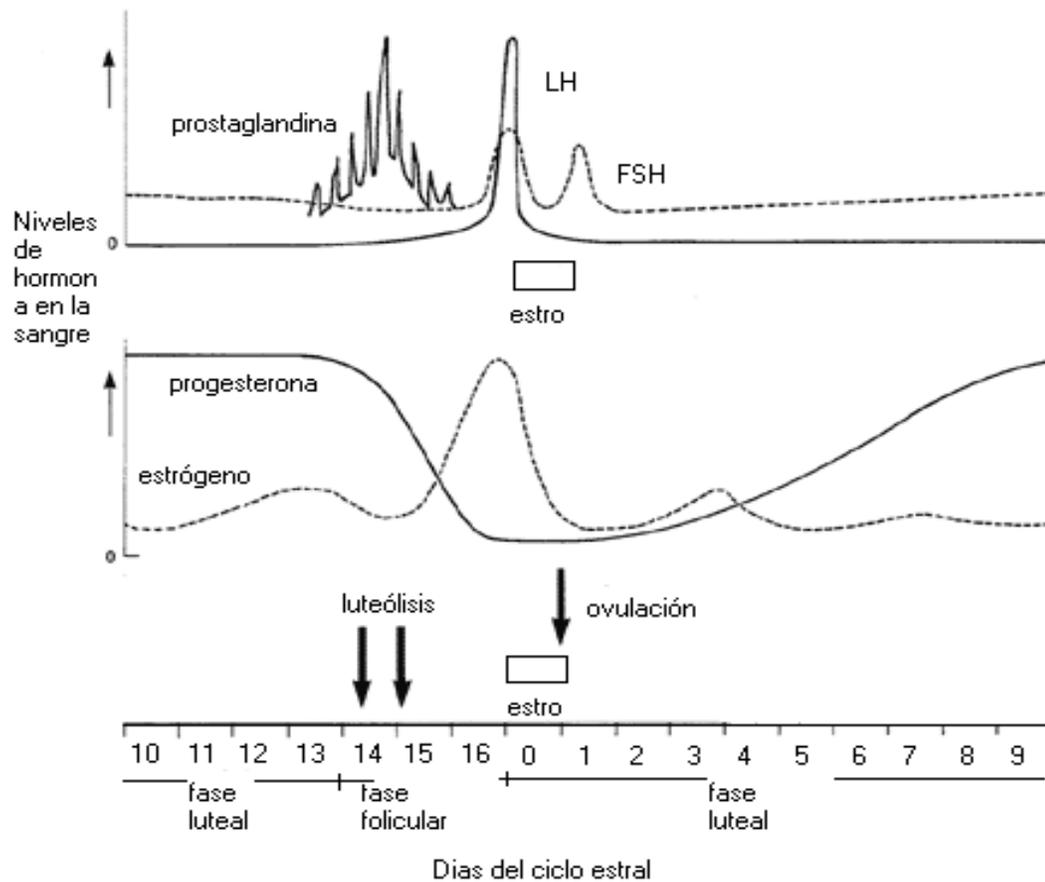
Los estrógenos en la oveja se observan picos de secreción a lo largo del ciclo estral que corresponde a diferentes periodos del crecimiento folicular. El último pico de estrógenos del ciclo representa probablemente el crecimiento preovulatorio del folículo, y es responsable de la secreción preovulatoria de la hormona LH. Se eleva justamente antes de la aparición del estro. La progesterona, su nivel es bajo durante los primeros días del ciclo y aumentan rápidamente del 3 al 11 del ciclo, para el día 14 ocurre un descenso dramático como consecuencia de la regresión del cuerpo lúteo. Así la actividad funcional del cuerpo lúteo y la producción de progesterona termina el día 15 en la oveja. Hacia el final de la fase lútea el endometrio secreta prostaglandina  $F2\alpha$ , saliendo por la vena uterina pasando a la arteria ovárica provocando así la regresión del cuerpo lúteo (Galina, y col., 1988).

Es ampliamente reconocido que la FSH estimula el crecimiento y el desarrollo folicular, la concentración declina gradualmente de esta hormona 2 o 3 días antes del estro, momento en que sobreviene la última oleada de crecimiento folicular. Los niveles de FSH, en la circulación periférica muestran dos picos después de iniciarse el estro, el primero coincide con la LH, el segundo ocurre 24 horas después en un momento en que la LH es bajo, (Pijoan, 1983). Ver figura 1.

## Etología.

Las manifestaciones del estro son más marcadas en la cabra que en la oveja. Los signos externos incluyen enrojecimiento de la vulva y la vagina con descargas de mucus, junto con manifestaciones de inquietud, elevación constante del rabo y frotamiento continuo del macho. Una hembra en estro persigue al macho y mantiene su atención sobre él, (Gareth y Maxwell, 1990).

Figura No 1. Cambios hormonales en el ciclo estral de la oveja



Fuente: Aguilar, (2001)

## Estación reproductiva.

Las ovejas están caracterizadas por ser poliéstricas estacionales. Su estación de crianza se extiende a partir de agosto a marzo, esto dependiendo de la raza y localización geográfica (Schoenian, 1999).

La actividad sexual de esta especie se inicia cuando las cantidades de horas-luz disminuye, (otoño-invierno), lo que permite que los nacimientos sean en

la primavera. Así en latitudes altas como EE.UU. y Chile la fertilidad es alta en septiembre, octubre y noviembre. Estudios han descubierto que la proporción más efectiva para iniciar celo en la mayoría de ovejas es ocho horas de luz en un día con dieciséis horas de oscuridad. Sin embargo, la oveja también trabaja bien en proporciones de 10 horas de luz a 14 horas de oscuridad. Ovejas más cerca del ecuador son menos afectadas con la estación (De Alba, 1985).

Según Urrutia y col., (2000) mencionan que en México la estación reproductiva abarca los meses de fin del verano, todo el otoño y principios de invierno; y la otra en la que no presenta celos y que comprende el resto del año, época conocida como estación de anestro, como se puede observar en la tabla 1.

En general (Pijoan, 1983), la estación reproductiva se extiende desde el principio del otoño hasta finales del invierno, indistintamente del hemisferio, sin embargo existen marcadas variaciones en el inicio y el final de la estación reproductiva dependiendo de la raza ovina y de la latitud a que se encuentren los animales.

Tabla 1. Tiempo de celos de las ovejas en México.

Raza	Inicio	Final
Rambouillet	Junio	Febrero
Corriedale	Julio	Enero
Suffolk	Agosto	Enero
Pelibuey	Junio	Marzo
Dorset	Junio	Febrero
Romney Marsh	Julio	Enero

Fuente: Urrutia y col., (2000).

Galina, y col., (1988) indica que los cambios en el fotoperíodo interviene en la liberación de gonadotropinas hipofisarias. Parece ser que las variaciones estacionales producen un aumento de la sensibilidad hipotalámica al mecanismo de retroalimentación negativa de los esteroides ováricos, y ha sugerido que la glándula pineal modifica la actividad endocrina mediante secreciones.

## **Animales donantes**

Son aquellos animales que por su superioridad genética son seleccionadas para donación de embriones

### **Selección**

Esto depende de los objetivos del programa y de los requerimientos de deban cumplir desde el punto de vista biotecnológico y zootécnico.

Criterios de selección:

Genético. Debe ser un animal sobresaliente en cuanto a producción de leche y/o carne, evaluando esto tanto en base a su propia producción como la de sus crías (Buschbeck, 2001).

Ciclos estrales regulares. Los ciclos estrales deben ser regulares de duración normal, y que presentes buenos antecedentes productivos (Zapien, 1990; Aspron, 1992).

Aspecto animal. Esto no debe descuidarse, el tipo de aspecto del animal, ya que muchas veces es lo que da mayor valor comercial a las crías (McDonald 1986).

Edad. Animales muy jóvenes producen pobres y pocos embriones, así como también animales viejos (Armstrong y Gareth 1983).

Condición corporal. Deben estar en buenas condiciones corporales. La salud de las donadoras es muy deseable. Estas deben estar sobre un plan de nutrición para permitir un alto incremento en la condición corporal dos semanas antes del tratamiento con progestágenos.

- a) Minerales y sales. Estos deben ser proporcionados adecuadamente.
- b) Vitaminas. Es necesario el acceso de forrajes, para proveer la vitamina A y además se requiere la suplementación de vitamina D.
- c) Proteína. Con una fuente abundante de heno de buena calidad con un nivel moderado de proteína (14% - 16%) es generalmente adecuada.

d) Energía. Es necesario el suministro de granos (McOnie, y col. 1992).

Razas. Esto está determinado en relación al objetivo de producción, ya sea carne, leche o lana.

Sanos. Todos los animales deben estar libres de enfermedades, especialmente aquellas que afectan la función reproductiva, además sin defectos anatómicos. Según la estación y ubicación geográfica deben de estar sometidas a un estricto control de vacunación y desparasitación para garantizar un buen estado de salud (Aspinall, 1999).

### **Manejo y preparación**

McOnie, y col., (1992), indican que existen mecanismos que hay que tener en cuenta que se deben conservar los animales donantes en su ambiente normal, desde la inducción de la superovulación hasta el lavado y recogida de embriones, evitándose situaciones extraordinarias que desencadenen estrés, tales como el manejo brusco con los perros, interrupciones dietéticas repentinas. Considerar que en animales estresados no responden a los tratamientos hormonales para inducir la superovulación independientemente del producto o la dosis aplicada.

La condición básica para una buena reacción de un animal a los tratamientos hormonales es un bienestar del mismo. Situaciones de manejo esporádicos como sujeción para la inyección o la inseminación artificial son inofensivos. Pero cualquier práctica de manejo prolongado en el tiempo que estrese al animal se debe evitar también tras la superovulación, puesto que interfiere en el desarrollo de los embriones (Herman, y col., 1994).

Según, Aspinall (1999), en un programa de inseminación artificial y transferencia de embriones, se recomienda para las ovejas tanto donadoras y receptoras deben estar en buenas condiciones, se debe evitar las tensiones en un plazo de 4-6 semanas antes o después del procedimiento. Es necesario además, no sobrealimentar a las receptoras después de la cirugía, únicamente se debe hacer en niveles de mantenimiento, por que el sobrealimentar puede causar una disminución de los niveles de hormona que mantiene la preñez.

## **Superovulación**

Superovulación es el término empleado al referirse a la producción de más de una ovulación, que es lo que sucede normalmente, mediante tratamientos hormonales que estimulan a los ovarios de la oveja, con la finalidad que al inseminarla produzca un número mayor de embriones.

Según, McDonald (1986), el término de superovulación se refiere a la producción de mas de una ovulación, mediante la aplicación de hormonas que estimulan a los ovarios de la hembra, con la finalidad de que al inseminarla produzca un número mayor de embriones.

Los programas de partos múltiples y transplante de embriones, dependen de la producción múltiple ovular La oveja entre otras especies presentan ovulaciones sencillas o dobles, y por tanto deben ser estimuladas para que superovulen. Hoy en día la superovulación es un medio práctico de inducir partos múltiples y hacer posible el transplante de embriones (Herman, y col., 1994).

Según Derivaux, (1961), indica que el propósito fundamental de inducir superovulación en la oveja, es aumentar el número de partos múltiples.

## **Superovulación con PMSG**

La gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) es una hormona producida en las cúpulas endometriales de la placenta de la yegua entre los días 35 y 150 de gestación. Su función biológica es desarrollar folículos mas grandes y con dosis altas se induce una superovulación.

La administración de PMSG resulta mas fácil, debido a que se administra una sola inyección. Sus resultados están en función de la dosis empleada, del intervalo entre el momento de la inyección y la aparición de calores y el grado de actividad funcional del cuerpo lúteo. El método más común de provocar superovulación en la oveja consiste en administrar intramuscularmente una dosis que va de 700 a 1300 UI de PMSG el día 12 del ciclo, aproximadamente 24 horas antes o después de remover el tratamiento de progestágeno, para producir un aumento en el número de óvulos (Derivaux, 1961).

Según Galina, y col., (1988), en ovinos se aplican cantidades de 1500 UI de PMSG inyectadas el día 12 del ciclo respectivamente induciendo así la superovulación de éste.

Para inducir la superovulación en las ovejas, durante la temporada normal de reproducción, es factible inyectar PMSG el día 12 o 13 del ciclo, con buenas consecuencias. Las inyecciones de 1250, 1500 y 2000 UI de PMSG, producen 2.61, 2.81 y 2.44 corderos por oveja (Sorensen, 1982).

Mutiga y Baker, (1982), obtuvieron buenos resultados al superovular 30 ovejas Merino de 4 a 6 años de edad con 35 a 40 kg de pesos vivo, con dosis de 1000 UI de PMSG, obteniendo 7.5 cuerpos lúteos y un 76% de embriones recuperados respectivamente.

Driancourt y Fry (1992), en un ensayo realizado con 21 ovejas de la raza Merino, sincronizadas con esponjas impregnadas de progesterona, fueron superovuladas con dosis de únicamente 1000 y 1500 U.I. de PMSG inyectadas intramuscularmente 48 horas antes de remover las esponjas.

### **Superovulación con FSH**

La FSH es una hormona secretada por la hipófisis anterior que estimula el crecimiento de folículos en el ovarios y la producción de estrógenos en las hembras, que a través de una serie de aplicaciones durante tres o más días se induce superovulaciones en la oveja.

Por otro lado Gonzáles y col., (2002), aclaran que existen algunos protocolos de superovulación en la que se dan ocho dosis de FSH decrecientes (1.5, 1.5, 1.5, 1.25, 1.25, 1,1, ml). Así mismo coincidiendo con la primera inyección de FSH se administran 0.5 ml de cloprosteno<sup>1</sup>. Este protocolo permite la obtención de una media de 15.9 cuerpos lúteos, 13.5 embriones recuperados y 7 embriones viables.

Sin embargo, Armstrong y Gareth, (1983), en un experimento llevado a cabo con 3 razas de ovinos las superovula con 8 inyecciones múltiples de 2.5 a 3 mg de FSH-P con intervalos de 12 horas.

---

<sup>1</sup> Estrumate.

Así también Jabbour y Gareth, (1991), superovularon ovejas de la raza Merino en dosis crecientes de 6, 12, 24 mg de FSH-O con dos inyecciones diarias durante tres días de la que obteniendo excelentes resultados.

Por otro lado, Smidt y Ellendorff, (1972), han realizado metodologías diferentes de superovulación, las que se basan inyectar con FSH aplicando dos dosis diarias durante tres días con 12 horas de intervalos, ( Wright, y col. 1981), en un ensayo con 28 ovejas dela raza Columbia entre 9 a 10 meses de edad, fueron superovuladas con dosis decrecientes de 5, 4 y 3 mg de FSH, 48 horas antes de remover el esponja intravaginal con una dosis total de 24 mg, en la que obtuvieron un 97% de fertilización y un 62% de embriones recuperados.

González y col., (2002), en estudios realizados en ganado ovino, la administración de FSH en los protocolos habituales, con inyecciones cada 12 horas, comienza a actuar sobre la población folicular presente en el ovario de la oveja entre 12 y 24 horas del tratamiento. Los folículos en crecimiento alcanzaran el tamaño preovulatorio entre las 36 y 60 horas, pero especialmente entre las 48 y 60 horas. Este perfil de crecimiento varía, en función del tipo de preparado comercial de FSH y de su protocolo de administración, sin embargo, una característica constante de los folículos que ovulan como consecuencia de la administración de dosis superovulatorias de gonadotropinas es su menor tamaño respecto al de los folículos ovulatorios presentes durante el ciclo sexual. Algunas cantidades de gonadotropinas superovulatorias aplicadas en ovejas se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Dosis de gonadotropinas para superovulación.

Gonadotropinas para el crecimiento folicular				Gonadotropinas para ovulación.	
Especie	Dias del ciclo	PMSG (UI)	FSH (mg)	LH (mg)	HCG (UI)
Oveja	12-14	1000-2000	12-20	50-75	1000-1500

Fuente: Hafez, (1980).

**Superovulación con FSH + LH (hormona folículo estimulante y hormona luteinizante).** En 1940 se demostró que la FSH, administrada en combinación con la LH , inducía superovulación en ganado bovino. Apartir de entonces se han realizado muchas investigaciones encaminadas a mejorar y descubrir métodos de superovulación en ovejas con FSH en combinación con LH. Allen, y col. (1982), obtuvieron excelentes resultados al superovular ovejas con FSH en combinación con LH. Sin embargo (Wright, y col., 1981), no encontró diferencias significativas al realizar un experimento con FSH + LH y la FSH sola.

La duración de uso de la esponja varía de acuerdo al programa, lo normal es de 9 a 14 días. Así también el tiempo y la dosis de FSH puede ser diferente, estas se aplican bajo la piel entre la grasa, a menudo es en el cuello ya que es una situación mas fácil. La gonadotropina PMSG se aplica dentro del músculo de la pierna trasera por lo regular es una buena localización. Las gonadotropinas se aplican en un rango de 12 horas entre la mañana y la tarde, sin embargo puede variar en algunos programas, en la tabla 3 se puede ver un programa de superovulación, (Buschbeck, 2001).

Tabla 3. Protocolo de superovulación en donadoras.

Día	Tiempo del día	Inyección de FSH	
1			Insertar la esponja
10			
	PM	1	2.5 ml FSH <sup>1</sup>
11	AM	2	1.25 ml FSH y prostglandina <sup>2</sup>
	PM	3	1.25 FSH
12	AM	4	1.25 FSH
	PM	5	1.25 , remover la esponja
13	AM	6	1.25 FSH
	PM		Dar 50 umg de GnRh
19	AM		Quitar alimento y agua (medio día)
20			Transferencia.

Fuente: Buschbeck, (2001).

<sup>1</sup> Folltropin

<sup>2</sup> Estrumate, 150 umg o 8 mg Lutalize

## **Receptoras de embriones**

Son todas las hembras que se seleccionan para que en estas se transfieran los embriones extraídos de los animales donantes y se lleve a cabo la gestación y la mantengan hasta el periodo de lactancia; estos pueden ser animales de cualquier raza o cruce, sin importar su producción, pero teniendo en cuenta de que se trate de animales sanos, jóvenes y buen desarrollo corporal. Todo animal sin patologías reproductivas o trastornos ginecológicos puede ser tomada como receptora. Desde el punto de vista genético en las receptoras no tiene mucho sentido, aun cuando no se pueda descartar del todo, la influencia materna de la receptora sobre los embriones y su desarrollo.

**Selección.** Son los mismos puntos que en las donadoras, pero se pueden emplear animales de cualquier raza o cruce, sin importar su producción, pero teniendo en cuenta de que se trate de animales:

- ❑ Jóvenes.
- ❑ Sanos.
- ❑ Buen desarrollo corporal (3-3.5 en la escala de 1-5)
- ❑ Buen estado nutricional
- ❑ Producción de leche regular.
- ❑ Vacunadas.
- ❑ Probadas reproductivamente, ideal de 1 a 2 nacimientos sencillos.
- ❑ Buenas ubres. (sanas y completas).
- ❑ Destetando 5 semanas a priori.

(Herman, y col., 1994).

## **Sincronización de celos**

El aprovechamiento a la sincronización de celo en el ganado viene a ser una atención sobre la alta manipulación de la fase luteal o folicular del ciclo estral.

En la oveja la oportunidad es generalmente grande durante la fase luteal, la cual es de larga duración y de mas sensibilidad a la manipulación. El éxito de las

técnicas de sincronización no siempre es del todo. Pero siempre provee un razonable nivel de fertilidad en la sincronización del ciclo (Schoenian, 1999).

Ventajas asociadas con la sincronización del ciclo estral en ovejas:

- ✓ Facilita el uso de la inseminación artificial.
- ✓ Disponibilidad para la transferencia de embriones.
- ✓ Ayuda en la inducción para la cría fuera de temporada.
- ✓ Concentra la época de nacimientos y un manejo adecuado de pariciones.
- ✓ Permite el óptimo manejo de las madres y crías.

La oveja tiene un gran potencial para mejorar y manipular su reproducción debido a su naturaleza como criadoras estacionales y de múltiple ovulación. Para la sincronización de celo de un programa animal se tiene 2 alternativas:

1. La primera es eliminar el cuerpo lúteo de tal forma que todas las hembras entren simultáneamente en la fase folicular del ciclo estral, (uso de PgF2alfa).
2. La segunda es la supresión del desarrollo folicular a través de la prolongación artificial de la fase luteal (uso de progestágenos) de tal forma que al suspender el tratamiento todas las hembras entren a la fase folicular en forma sincronizada (Mellado, 1999).

En investigación, esta técnica es de gran importancia ya que permite formar grupos homogéneos en cuanto al periodo del ciclo estral en que se encuentren. En la aplicación del control del estro como técnica de reproducción animal es el caso del que trataremos, los trasplantes de embriones ya que de no ser así, se requerirían de muchos animales (donantes y receptoras) para poder obtener hembras en la misma fase del ciclo estral en un momento determinado.

Para imitar la función del cuerpo lúteo se han utilizados los progestágenos, los cuales actúan a nivel hipotalámico, inhibiendo la secreción de los factores liberadores de gonadotropinas ocasionando que la actividad ovárica no se reanude hasta que se elimine el efecto inhibitorio en el desarrollo folicular. Al suspender el tratamiento disminuyen los niveles sanguíneos del progestágeno, el hipotálamo libera el GnRH y la hipófisis secreta las gonadotropinas que inducirán

el estro. Con este método el hipotálamo ahorra sus factores de liberación, lo que explica su capacidad para inducir el celo incluso durante la época de anestro. (Wildeus, 1993).

### **Método de los progestágenos y su aplicación**

La aplicación de los progestágenos pueden ser por diferentes vías: oral, parenteral (inyección o implante) y en forma de implante vaginal que es la que actualmente se utiliza. Las dos primeras son difícil de aplicar en forma práctica, la forma parenteral de estas drogas en periodos de 12 a 20 días en rebaños grandes implica excesivo trabajo; por otro lado la administración del medicamento en el alimento presenta problemas de dosificación, ya que siempre habrá animales que ingieran mas que otros, Galina, y col., (1988). Por lo que resulta viable y adecuado aplicar estos compuestos vía vaginal, por su simplicidad y conveniencia (Boland, y col., 1983).

### **Esponjas con progestágenos**

Los tipos básicos de productos disponibles para la sincronización son las prostaglandinas, progesteronas y hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) (Mellado, 1999).

En la oveja se han utilizado gran variedad de progestágenos entre los cuales se mencionan: la misma progesterona, la medroxiprogesterona (MAP), el acetato de mengestrol (MGA) y el mas usado actualmente el acetato de Fluorogestona (FGA o Chronolone). Estos tipos de esponjas también se han utilizado en combinación con PMSG, FSH y Prostaglandinas. Las esponjas impregnadas con progesterona natural en altas dosis (400-500 mg) se han utilizado y tienen una similar sincronización y fertilidad que las esponjas impregnadas con progesterona sintética (Hamra, y col.,1986 ; Gareth y Maxwell, 1990).

Mellado, (1999), menciona que en la inducción de celo y la ovulación en la oveja se puede llevar a cabo tanto en el periodo de anestro como de actividad sexual. La única diferencia en el tratamiento, dependiendo de la época, es el uso,

además de los progestágenos, de gonadotropinas durante el periodo de anestro. Es importante señalar que en ovejas en anestro, para la inducción de celo se obtienen tasas de pariciones del 59%, si se aplica únicamente progestágeno sintético; mientras que si se acompaña con gonadotropinas se obtienen tasas de preñez que sobrepasan el 90%.

En ovejas de anestro estacional la sincronización y superovulación pueden ser inducida exitosamente con la aplicación de MAP, llegándose a obtener un rango del 76.8% al 100% de sincronización y con una tasa reproductiva del 84%, (Allen, y col., 1982; Bonino y Hughes, 1995).

Wildeus, (1993) concluye que este tipo de tratamiento, sin embargo provee o es inefectivo para la inducción de celo y la ovulación en ovejas que experimentan anestro lactacional. El modo de aplicación y dosis de progesterona-PMSG/FSH para la crianza fuera de estación es similar para la etapa dentro de la estación reproductiva.

Greaney, y col., (1997), al realizar una comparación a través de dos periodos estacionales en cinco razas de ovejas, sugieren que la transferencia de embriones puede ser exitosamente conducida fuera de estación reproductiva en aquellas razas importadas.

Córdoba y col., (1999), obtuvieron un promedio del 95.8% de sincronización de celos en 54 ovejas criollas, en las que 24 fueron anestricas estacionales, utilizando esponjas intravaginales con Acetato de Flurogestona (FGA) en dosis de 30 mg durante 14 días aplicado 2.5 ml de PMSG vía intramuscular.

Un medio alternativo que suple continuamente de progesterona exógena ha sido el (CIDR-S y el CIDR-G) desarrollado en Nueva Zelanda para cabras y ovejas, son dispositivos que liberan progesterona mas lentamente y esta fabricado de nylon. Usando tratamientos de este producto en ovejas, indican una respuesta similar en comparación con las esponjas embebidas de progesterona. (Hamra, et. al. 1989).

## **Colocación y retiro de las esponjas**

La inserción de las esponjas se suele tratar con polvo o antibióticos. El aplicador también se debe humedecer con una solución antiséptica que ayuda a lubricar y desinfectarlo. La esponja se sitúa en la parte ancha del aplicador y se empuja hasta el otro extremo con la ayuda de la varilla, de tal forma que el cordel queda en el interior de todo el recorrido del aplicador (Gareth y Maxwell, 1990).

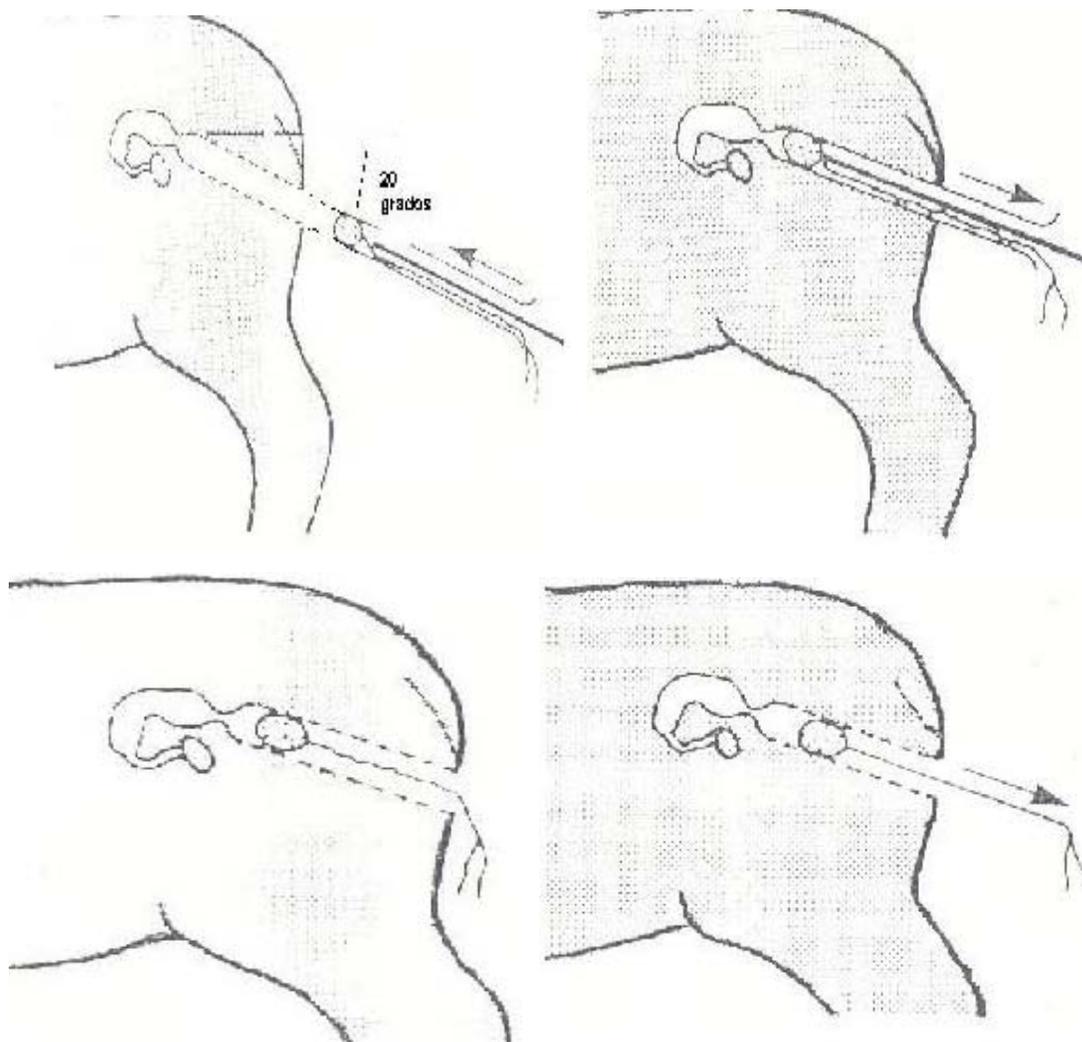
A continuación se inserta, junto con la varilla, en la vagina de hembra a una profundidad de 10 a 15 cm sin que para ello se precise aplicar mucha fuerza. La hembra debe estar en posición natural ya que si está torcida o arrodillada el aplicador puede perforar la pared vaginal. Una vez en posición, la esponja se empuja con la ayuda de la varilla, dejándola en la vagina anterior. Al retirar el aplicador se debe procurar que la cuerda quede profunda unos 15-20 cm de la vagina. El aplicador deberá luego de ser usado desinfectado en un baño que contenga una solución antiséptica antes de utilizarlo en otra hembra. En las hembras vírgenes pueden tener vaginas muy cerradas; en tales casos no debe utilizarse el aplicador, es mejor empujarlo la esponja con el propio dedo. Las esponjas se retiran después de transcurrido el periodo de inserción recomendado (12-14 días para ovejas). Esta se tira hacia fuera, de la parte de cordel profunda, inclinándola ligeramente hacia abajo y con mucha suavidad, aunque con firmeza (Gareth y Maxwell, 1990). Una vez retirada las esponjas, la mayoría de las hembras presentan estros a los 2-3 días, durante la estación reproductiva. Ver figura 2.

## **Método de prostaglandinas y su aplicación.**

Las prostaglandinas u otros análogos, son extensamente usados para la sincronización de estros en el ganado, pero los resultados tienden a no ser satisfactorios en cabras y ovejas (Henderson, y col., 1984).

En el caso de la regresión del cuerpo lúteo, actualmente con el uso de las  $PGF2\alpha$  es posible realizarlas sin complicaciones posteriores, en un periodo corto se podrá obtener un estro fértil (Schoenian, 1999).

Figura No 2. Aplicación de esponjas con progesterona.



Fuente: Gareth y Maxwell, (1990)

Además un cuerpo lúteo funcional es requerido de  $PGF_{2\alpha}$  para su regresión, por lo tanto esta técnica es idónea para la sincronización durante la estación reproductiva. En las ovejas el cuerpo lúteo es muy sensible para la regresión por la  $PGF_{2\alpha}$  entre los días 5 a 16 del ciclo estral respectivamente. Una aplicación de esta droga logrará sincronizar un cierto porcentaje del rebaño (60-70%), pero si se da una segunda dosis entre 8 y 11 días después aparecerán

sincronizadas el 100% del rebaño. Las dosis empleadas de prostaglandinas varían de 10 mg a 100 y 150 mg aproximadamente (Galina, y col., 1988).

Existen en el mercado prostaglandinas sintéticas, en forma inyectables tales como Cloprostenol<sup>1</sup> y Prosolvin<sup>2</sup>, que son mas potentes que la forma natural. Una dosis de 125 mg de Cloprostenol es efectiva para inducir la regresión lútea de las ovejas y cabras. La dosis recomendada por los fabricantes para Prosolvin es de 3.75 mg tanto para oveja como para cabras. El Lutalize<sup>3</sup> es una forma natural de prostaglandina; una dosis de 15 mg es la recomendada como efectiva para las ovejas (Gareth y Maxwell, 1990).

### **Sincronización donadora-receptora**

El sincronismo que se establece entre la donante y la receptora condiciona el éxito de la transferencia, pues para la nutrición del embrión resulta necesario que el ambiente uterino de ambas sea similares. El ciclo de la donadora y la recipiente debe ser sincronizado idealmente, la donante y la receptora deben estar en calor (estro) y ovular dentro de 12 horas, para que el ambiente uterino sea lo mas similar al de la donante. Ambas deben ser sincronizadas tan cerca como sea posible, con una sincronía de mas o menos 24 horas dan tasas aceptables de preñez. A pesar de la manipulación hormonal de su ciclo reproductivo, algunas receptoras potenciales no sincronizan ni se encuentran disponibles para la transferencia. Por lo que es necesario asegurarse de disponer receptoras por donadoras, por lo que se recomienda 6 ovejas o 10 deben ser sincronizadas por donantes (McOnie, y col., 1992).

Cutini y col., (2000). Indica que se puede tolerar hasta un sincronismo de 48 horas, y se pueden observar que no se producen grandes diferencias de preñez con sincronismo de hasta 36 horas, no obstante se considera que para la obtención de buenos resultados no se debe superar las 24 horas de sincronismo.

Sin embargo es necesario considerar el sincronismo embrión- receptora, ya que si tenemos en cuenta que un animal superovulado, los folículos pueden ovular en un periodo largo y que además el desarrollo del embrión se acelera, el

---

<sup>1</sup> Estrumate, <sup>2</sup> Intervet <sup>3</sup> Upjohn

sincronismo entre la donante y la receptora puede no ser el mejor indicador a tener en cuenta en el momento de decidir qué embrión transferir en una determinada receptora. Es por ello que, en el momento de efectuar una transferencia, debe ser considerado también el sincronismo embrión-receptora. Si una recolección se lleva a cabo en el día 7 y contamos con receptoras disponibles entre los días 6 y 8 del ciclo estral, las mórulas deben ser transferidas a las del día 6, las mórulas compactas y blastocistos tempranos a las del día 7 y los blastocisto expandidos a las del día 8. Cuando se transfieren embriones congelados, las receptoras deben estar en sincronismo con el estadio de desarrollo del embrión al momento de la congelación (Cutini y col., 2000).

Cuando se tiene embriones congelados es necesario transferir 2 embriones por recipientes. Además cuando la disponibilidad de receptoras es limitada, hasta tres embriones pueden ser transferidos en una receptora (asumiendo que es un animal relativamente grande). Y cuando está muy limitado los números de receptoras, los embriones sobrantes pueden ser congelados. (Kunkel, 1992).

El éxito del trasplante depende en gran parte de la sincronización perfecta entre los ciclos de la donante y la receptora.

Derivaux, (1961), afirma que no debe existir mas de dos días de diferencia entre el ciclo del donante y el de la receptora si se quiere conseguir un resultado positivo en el trasplante.

Sorensen, (1982), en un experimento realizado se produjo 91% de concepción cuando donadoras y receptoras entraron en celo el mismo día, comparando con 54, 35 y 10%, cuando había una diferencia de 1,2, 3 días, respectivamente.

Los programas de sincronización de receptoras varían, pero por lo regular el día 0 es insertado el esponja vaginal.

El día 10, se inyecta prostaglandina.

El día 12 pm se remueve el esponja y se aplican 500 UI PMSG intra muscular.

El día 13 pm, introducir un carnero vasectomizado por 24 horas o en su caso dar 50 ugm GNRH.

El día 19 al medio día quitar el agua y alimento.

Día 20, transferir los embriones  
(Stellflug, 1998).

## **Inseminación**

Evolución de la inseminación artificial en ovejas.

Desde los años 60's, generalmente las inseminaciones se realizaban vía vaginal, con semen fresco; seguidamente se practicaron a través del cérvix, con semen fresco y congelado. Para los 80's se practicaba ya la inseminación laparoscopia, desarrollado por (Killen and Caffery, 1982) citados por (McKusick, y col., 1997); después se procedió a realizar inseminaciones trans-cervical en los años 90's con semen congelado.

La tasa de concepción por lo regular es del 60%, especialmente en rumiantes, esto debido al tamaño corporal y mas por su anatomía del tracto reproductivo. Por naturaleza la oveja tiene el cérvix mucho mas largo y mas compleja que otros animales rumiantes. Es de aproximadamente 7 cm de longitud y posee 6 a 7 anillos que hacen el paso del equipo de IA muy difícil, inclusive hasta peligroso para la oveja; además de que existe una aleta de tejido fino en la abertura del cérvix que hace aun mas difícil la entrada a través del primer anillo (Schoenian, 1999).

En las ovejas existen 3 métodos de inseminación: vaginal, cervical o intracervical e intrauterina, existen mucha diferencia en cuanto al éxito y su ejecución. Sin embargo existen dos tipos mas comunes de inseminación artificial usados en la producción de ovejas: Cervical y Laparoscópica (Gareth y Maxwell, 1990).

Características de inseminación artificial según su ubicación.

- Vaginal
  - Fácil
  - Reduce el éxito de preñez
  - Únicamente se realiza con semen fresco
- Cervical

Se dificulta mas. En la oveja principalmente.

El éxito es mayor en cuanto se incrementa la penetración.

Se utiliza semen fresco y congelado

Bajos costo.

Necesario de entrenamiento.

Resultados inconsistentes.

➤ Uterino

Mucho mas dificultoso para ovejas.

Mejora mas los resultados.

Se utiliza semen fresco y congelado (Buckrell, 2000.)

### **La inseminación vaginal**

En este procedimiento el semen se deposita en la vagina, sin pasar el cérvix, tal como sucede en forma natural, utilizando semen fresco diluido y mayor dosis que los otros. Se indica que los resultados son muy bajos, con este método (Sorensen, 1982).

Para su ejecución se utiliza únicamente pipeta de plástico a través de una jeringa. Para esto es necesario limpiar la vulva e introducir la pipeta en la parte superior para evitar adherencia con la uretra, la pipeta se carga con dosis de semen requerida, luego de dejar una cámara de aire de 0.2 ml en la jeringa. Si bien la misma pipeta puede reutilizarse varias veces, es importante que esta se limpie con un algodón o gasa entre hembra y hembra (Bearden y Fuquay 1982).

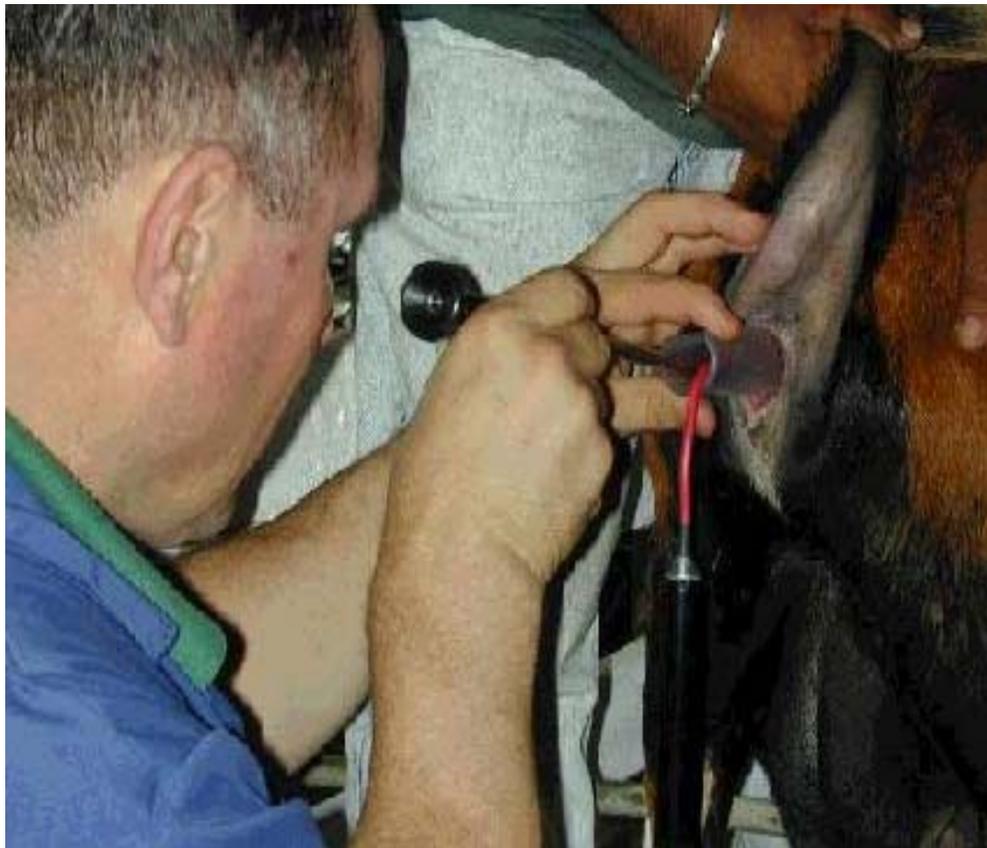
### **Inseminación cervical o intra-cervical**

Con este método el semen se deposita dentro del cuello uterino o dentro del cérvix, a través de la vagina con una profundidad de 3 cm, convirtiéndose pues casi en una inseminación intrauterina. Es necesario un espéculo (tubo de 4x15 cm) con fuente de luz para observar el cuello uterino; pipetas y una jeringa de 2.5 ml o pistola de inseminación, (Gareth y Maxwell 1990). Ver figura 3.

El espéculo se introduce hasta una profundidad de 10-13 cm. Una vez que el cerviz es localizado, la pipeta de inseminación se introduce hasta la mayor

profundidad posible, sin forzarla. Antes de descargar el semen se retira un poco el vaginoscopio hacia atrás a fin de facilitar el cierre de la vagina anterior evitando que el semen se derrame. Posteriormente se retira primero la pipeta y luego el vaginoscopio (Borquez y Cabral, 1997).

Figura No 3. Inseminación trans-cervical



Fuente: Schoenian, (1999)

Usando semen diluido fresco, tiene la ventaja de ser una operación relativamente simple y, potencialmente una gran cantidad de animales pueden ser inseminados durante un corto tiempo. Debido a la anatomía que presenta el cérvix de la oveja, la transferencia de embriones, inseminación artificial y colección de embriones en forma transcervical es muy dificultoso. Redondo y Fernández, (2001) mencionan que la oveja posee de 5 a 7 anillos lo que impide, que en la práctica la inseminación cervical similar a la de los bóvidos tenga éxito.

Para este procedimiento se ha utilizado oxitocina exógena para dilatar el cervix durante el estro y fase luteal del ciclo, con la finalidad de poder realizar el procedimiento transcervical. Los resultados indican que el procedimiento no afecta el movimiento del espermatozoides al sitio de fertilización en los oviductos, y no reduce la tasa de ovulación. Sin embargo a pesar de que este procedimiento es compatiblemente simple y barato, además de ser libre de riesgos que con la cirugía implica, es mucho menor todavía el éxito obtenido que los procedimientos de Laparotomía y Laparoscopia (Greg. y col., 1999).

### **Inseminación intrauterina**

Es la mas común en los programas de transferencia de embriones, se puede utilizar semen congelado o fresco. Este método es mas complicado por que es necesario la cirugía. Con la ayuda de una laparoscopia que implica una cirugía de menor importancia en el que el semen es depositado directamente en el útero. Esto permite resultados mas acertados, y flexibilidad en la selección del padre, especialmente usando semen congelado. En este procedimiento el semen se puede además depositar directamente en los cuernos uterinos, esto implica un procedimiento quirúrgico con mínimos riesgos importantes (Aspinal, 1999).

Se procede a esquilarse el abdomen, luego se aplica un anestésico local debajo de la piel. Dos incisiones pequeñas se hacen con una navaja quirúrgica. Los instrumentos quirúrgicos (trocánteres y cánulas) se insertan a través de las incisiones y se empujan a través de la pared del cuerpo en la cavidad peritoneal de la oveja. Los trocánteres se sustituyen por un laparoscopio (fuente de luz), en la que el operador podrá ver a través de este, para localizar la zona reproductiva. La cavidad peritoneal se infla con CO<sub>2</sub> para permitir que el útero sea observado. Ver figura 4.

Después de la inseminación, se quita el equipo y se permite a la oveja caminar para su recuperación. Si no existe sangría, no es necesario cerrar los sitios de incisión, sin embargo se le da una inyección de antibiótico para prevenir infecciones. La inseminación artificial laparoscópica toma menos de 5 minutos por

oveja cuando es realizado por un operador experto, y la ovejas se recuperan sin un efecto perjudicial. De hecho pueden ser inseminadas en años subsecuentes utilizando el mismo procedimiento. Las tasas de preñez varían alrededor del 70-85% (Schoenian, 1999).

Figura No 4. Técnica de inseminación vía laparoscopia



Fuente: Schoenian, (1999).

Inseminación por laparoscopia.

Características:

- Lo mejor posible utilizar semen congelado.
- Baja dosis de semen.
- Con un rango de (30%-90%).
- Mas costoso.

- Riesgos de cirugía.
- Procedimiento simple.

En nuestros días el semen fresco es mucho mejor para la IA. Los programas de inseminación artificial, pueden ser con:

1. Con semen fresco
2. Con semen congelado.

(McKusick, y col.1997).

Según Aspinall, (1999), con semen fresco o descongelado en el que se coloca directamente en el útero con la ayuda de un laparoscopio, se obtienen tasas medias de preñez de 70-90% comparados con un promedio de 55-65% utilizando la técnica cervical

Además Robinson, y col., (1989), indican que después de una inseminación intrauterina, se llega a obtener un promedio de 95%-100% intrauterina y 80%-90% con inseminación cervical.

Con la inseminación intrauterina se han obtenido altas tasas de fertilización del 75.3% respectivamente; a través de una laparotomía media ventral, en la que los cuernos uterinos son exteriorizados, aplicando 0.4 ml de semen diluido en proporción 1:1 con PBS y con 1% de glucosa en la que es inyectado dentro del lumen uterino en cada cuerno (Rexroad y Powell, 1991). . En la tabla 4 se pueden ver los diferentes resultados de preñez en ovinos con diferentes métodos de inseminación y con tipos de semen.

Tabla: 4. Resultados de los métodos de inseminación, con semen fresco y congelado.

	Fresco	Congelado
Vaginal	40-50%	10-20%
Cervical	40-65%	25%
Transcervical	60-80%	40-70%
Laparoscopia	70-90%	50-80%

Fuente: Buckrell, (2000).

## **Métodos de recuperación de embriones**

Simultáneamente con el uso de la cirugía para la recuperación de embriones durante la década de los 70's, también se utilizó la transferencia quirúrgica. Además de los problemas normales de la cirugía y uso de anestesia, estas técnicas requieren de mayores recursos humanos, equipo y tiempo de trabajo.

Los ovocitos fertilizados en su mayoría se recogen en diversos momentos del periodo que va de la fecundación a la implantación, generalmente después de la migración hacia el útero. Después de 9 días, la recogida y los indicios de gestación se reducen un poco, al menos con la transferencia quirúrgica. En la oveja a los 6-7 días después de la inseminación los óvulos no fertilizados y embriones se encuentran libremente suspendidos en el cuerno uterino, por lo que es en estos días en que se realiza la colección de embriones (McOnie, y col. 1992).

Amoah y Gelaye, (1988) mencionan que la recuperación temprana de embriones es difícil debido al problema de distinguir embriones de huevos no fertilizados

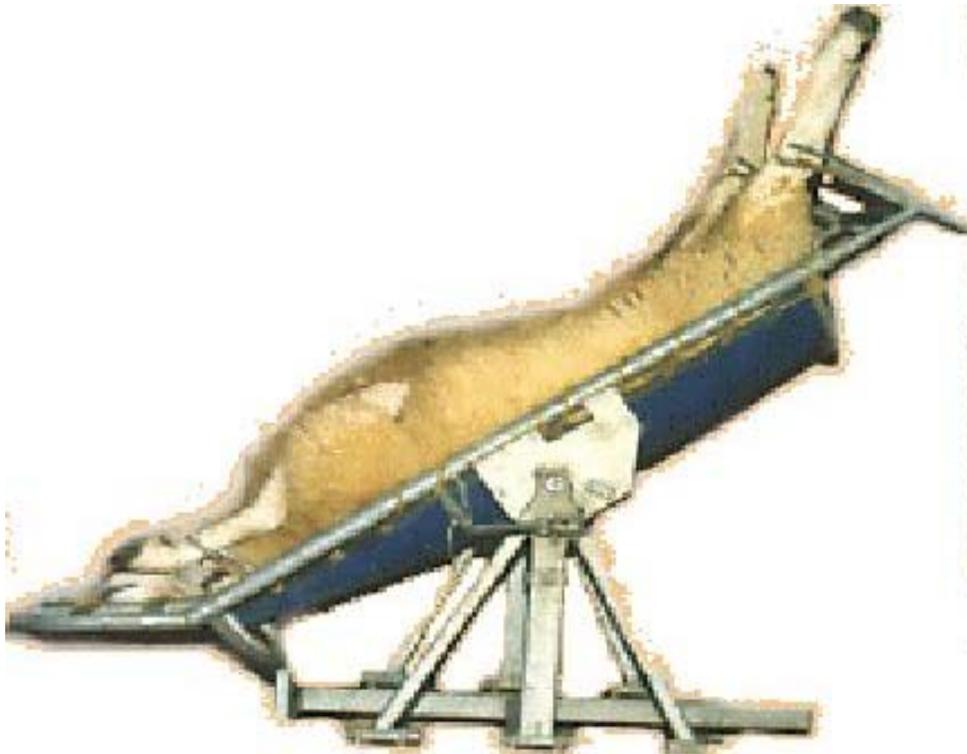
La recogida quirúrgica es eficaz en todas las especies y es el método de elección para los óvidos, caprinos y suinos. Es el único medio práctico de obtención de embriones localizados en los oviductos de la oveja. Es difícil pasar un dispositivo recolector al útero a través del cérvix, ya que presenta demasiada reducción como para la manipulación de extracción y transferencia transcervical (Brackett, y col., 1988).

## **Preparación pre-operativa de la oveja**

Stellflug, (1998). Dice que el animal se debe de privar del alimento y agua alrededor de 24-48 horas antes de realizar la laparotomía, para evitar el contenido en la vejiga y el rumen, reduciendo así las contracciones lo que dificultaría la extracción y manipulación del útero. Se procede a colocarla en forma dorsal y recostada en una horquilla quirúrgica y asegurarla, cabe señalar que la oveja debe ser ubicada en posición de 45° con la cabeza hacia abajo, procediendo después a

esquilar muy bien de izquierda a derecha de los flancos, y luego se afeitar en un área de 1-2 pulgadas cuadradas en el sitio de incisión en la que se procede al lavado de la zona con una solución de alcohol al 70%. Finalmente se aplican 0.20 ml de anestesia Xilazin (Hafez, 1980). Ver la figura 5.

Figura No 5. Posición pre-operativa.



Fuente: Aspinall, (1999).

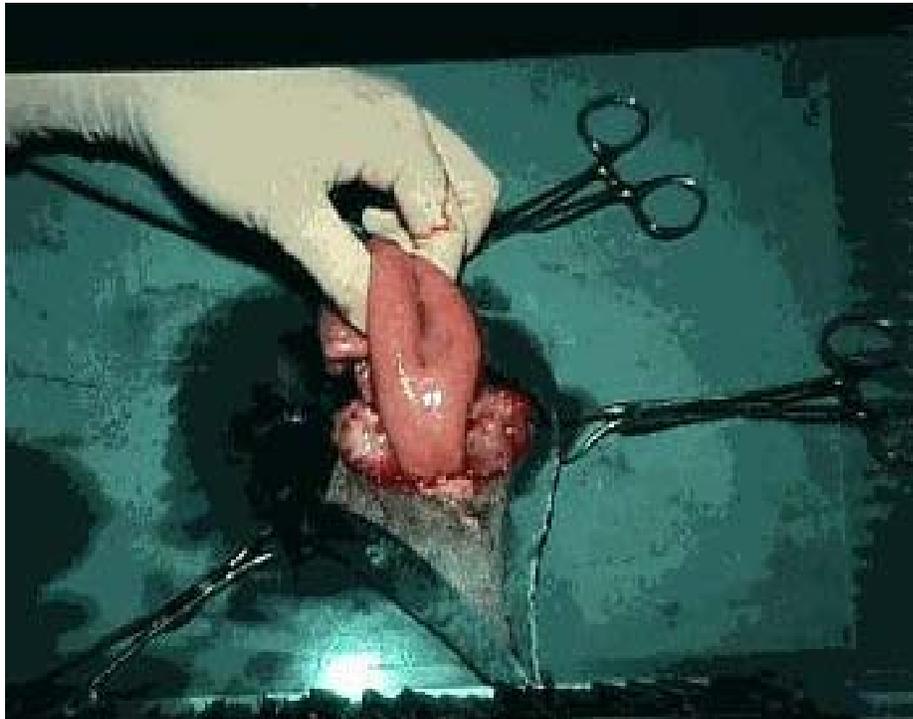
### **Laparotomía**

El procedimiento se lleva acabo a través de una incisión de 7 a 10 cm en la línea media ventral aproximadamente una pulgada al inicio de la ubre en la zona craneal de este. Antes se coloca una tela esterilizada y precortada en el área preparada para la cirugía (Stellflug, 1998).

Después se procede a la incisión para exteriorizar los cuernos uterinos. La incisión debe ser lo suficientemente grande para permitir que el útero y los ovarios sean exteriorizados. La recolección se realiza por medio de una cánula de vidrio o de polietileno, en la que es introducido a través de la fimbria. Con una jeringa se

aplican 2-20 ml del medio a través del oviducto de la parte superior del cuerno uterino hacia la fimbria de donde se colectará los embriones. Finalmente se sutura la incisión, en la que primero es el músculo y después la piel. Al final se aplican un desinfectante en la herida y una inyección de antibiótico que se realizará hasta el cierre de la herida (Hafez, 1980). Ver figura 6.

Figura No 6 . Extracción de los cuernos uterinos a través de una laparotomía media.



Fuente: Buschbeck,( 2001).

Según Stellflug, (1998) la incisión se debe realizar muy cerca de la bifurcación del útero, para insertar el tubo de recolección, en la que a través de una jeringuilla de 35 ml llena de solución se inserta en la parte distal del oviducto, vía infundíbulo, el líquido deberá fluir hacia el tubo de colección para ser colectado en una caja de petri esterilizada.

El lavado se puede realizar de dos maneras, de la fimbria hacia los úteros o de la unión uterotubárica hacia la fimbria.

El método fimbria – útero es el mas adecuado, por que un alto porcentaje de embriones son recuperados con pequeños daños al tracto reproductivo, sin embargo existen las adhesiones periovario en algunos animales.

El método uterotubárica – fimbria, en la que el medio de lavado es introducido dentro del ámpula del oviducto. Este método posee una desventaja que es la frecuente formación de adhesiones post-operativa de los úteros o de los oviductos (Hafez, 1980). En la figura 7 se pueden ver las diferentes técnicas de lavado para la extracción de embriones.

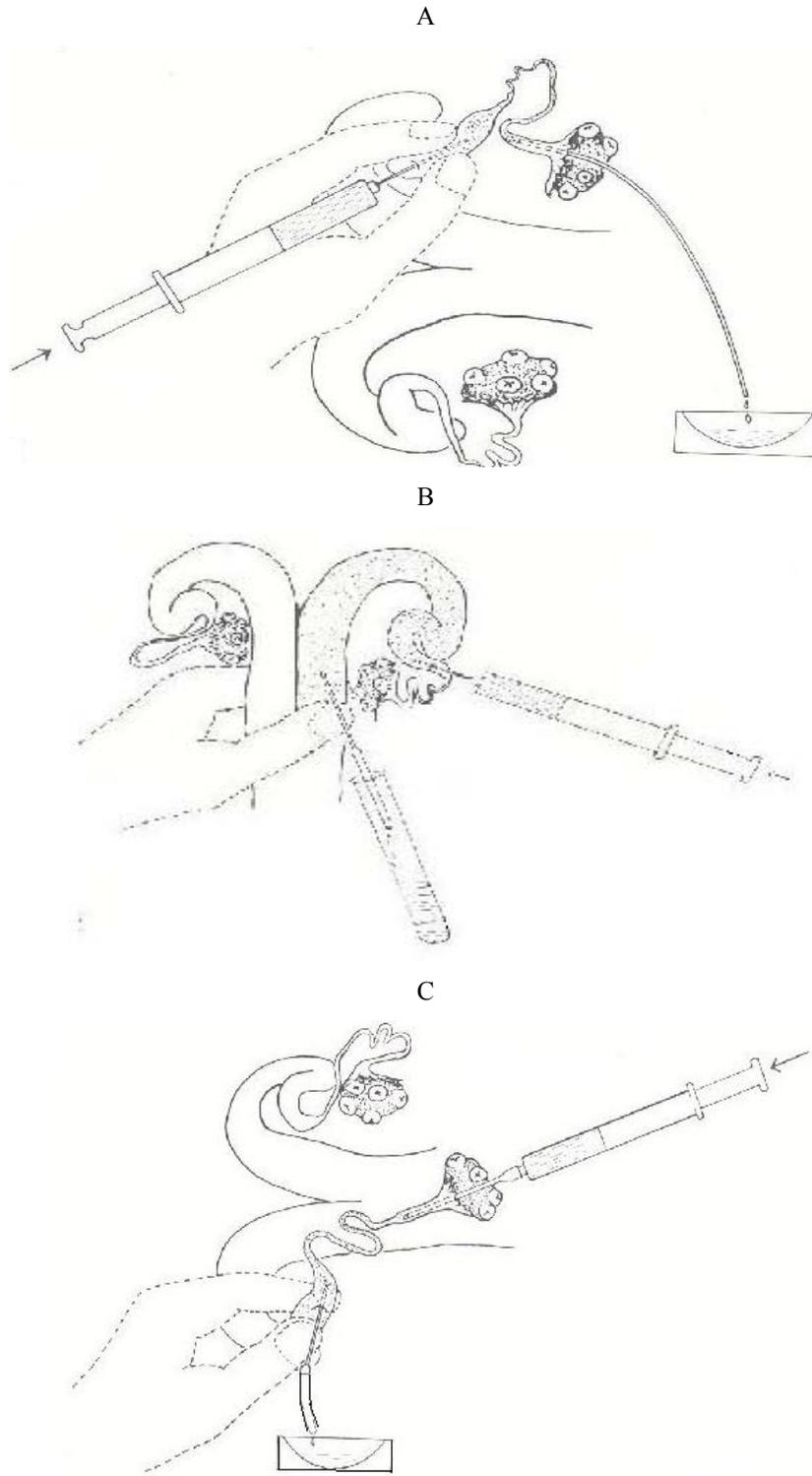
El procedimiento es fiable y eficiente, pero frecuentemente lleva consigo adhesiones post-operativas que pueden perjudicar la fertilidad siguiente o impedir totalmente el uso del animal para un siguiente servicio en el programa (Bearden y Fuquay, 1982).

Nellenschule y Niemann, (1992). Aclaran que se pueden realizar lavados haciendo una sola incisión en el cuerno uterino en la que se introduce una cánula hecho de acero en el lumen uterino que contiene un catéter flexible, el globo se infla y el catéter se introduce cuidadosamente hasta la punta del cuerno uterino luego se procede a introducir el medio a través de una jeringa y que es extraído a través del catéter flexible y colectado.

Boggio y col., (1995), colocaron un catéter Foley en el cuerno uterino de un grupo de ovejas perforando la pared de su base, el catéter fue anclado inflando el globo con 5 ml de aire; en la que se realizaron 5 lavados de 5-6 ml cada uno, se recolectó el medio a través del mismo catéter. El medio recuperado se ubicó en placas de Petri, y se observaron al microscopio estereoscopio para la búsqueda de los embriones, en la que obtuvieron un 75.4% de embriones por este método.

Por otro lado en otro grupo recuperan embriones a través de la extracción quirúrgica, inyectando 20 ml de medio en el cuerno uterino y recuperándolo a través de una cánula plástica de 1.6 mm diámetro interno colocada en la ámpula del oviducto, en la que obtuvo un 54.8% de embriones. El uso de catéter Foley permite un aumento del 20.6% mas que el método tradicional. Además casi el

Figura No 7. Técnicas quirúrgicas de recuperación de embriones. A, lavado del oviducto hacia la fimbria; B, del oviducto hacia la unión útero-oviducto; C, de la fimbria hacia el cuerno uterino.



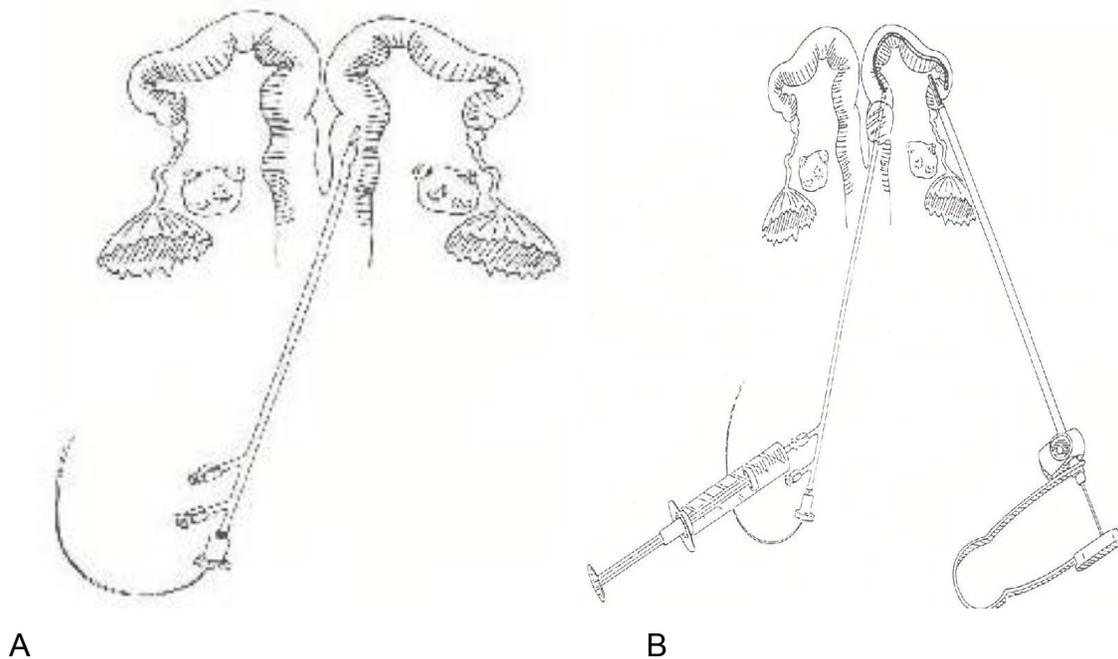
Hafez, (1980).

100% de animales sometidos a una recuperación de embriones por el método tradicional existió adherencias en el tracto reproductivo, disminuyendo estas en forma considerable con el uso del catéter Foley.

Además Boggio, (1997), después de 6-6.5 días del servicio recolectó embriones a 13 ovejas Corriedale a través de un catéter Foley, obteniendo un 79.1% de embriones por este método. Ver figura 8.

Según Sorensen, (1982), la recuperación de embriones en ovinos con el catéter Foley se logra en un 83%.

Figura No 8. Lavados a través de catéter.



Nellenschule and Niemann (1992).

## Laparoscopia

Actualmente se está utilizando la laparoscopia, para la colección de embriones, que consiste en un dispositivo fibroscópico rígido en la que se inserta a través de una incisión pequeña en la piel para permitir la evaluación de la respuesta a la superovulación. Si existe una evidencia de varios cuerpos lúteos en ambos ovarios, entonces los cuernos se elevan a través de una incisión pequeña (4 cm) en la línea media, un catéter de goma suave de Foley se introduce al cuerno uterino y la punta del catéter es inflado para aislar el útero. Una solución

estéril se aplica en la extremidad del cuerno uterino a través de otro catéter para llevar los embriones fuera del útero a través del catéter Foley y en un plato pequeño de colección. El procedimiento se repite con el otro el otro cuerno uterino. Finalmente también las incisiones son cerradas, y la oveja se le aplica prostaglandina para ayudarle a eliminar cualquier desecho (McOnie, y col., 1992).

Así mismo Stellflug, (1998) con la ayuda del laparoscopio resulta suficiente hacer 3 incisiones de (1-1.5 cm) en la piel; dos incisiones aproximadamente 4-6 pulgadas delante de la ubre, uno en cada lado de la línea media y la tercera incisión 2 pulgadas con respecto a la ubre sobre la línea media para poder realizar la colección de embriones. En esto es necesario inflar la cavidad peritoneal con una cantidad mínima de CO<sub>2</sub> antes de insertar las herramientas.

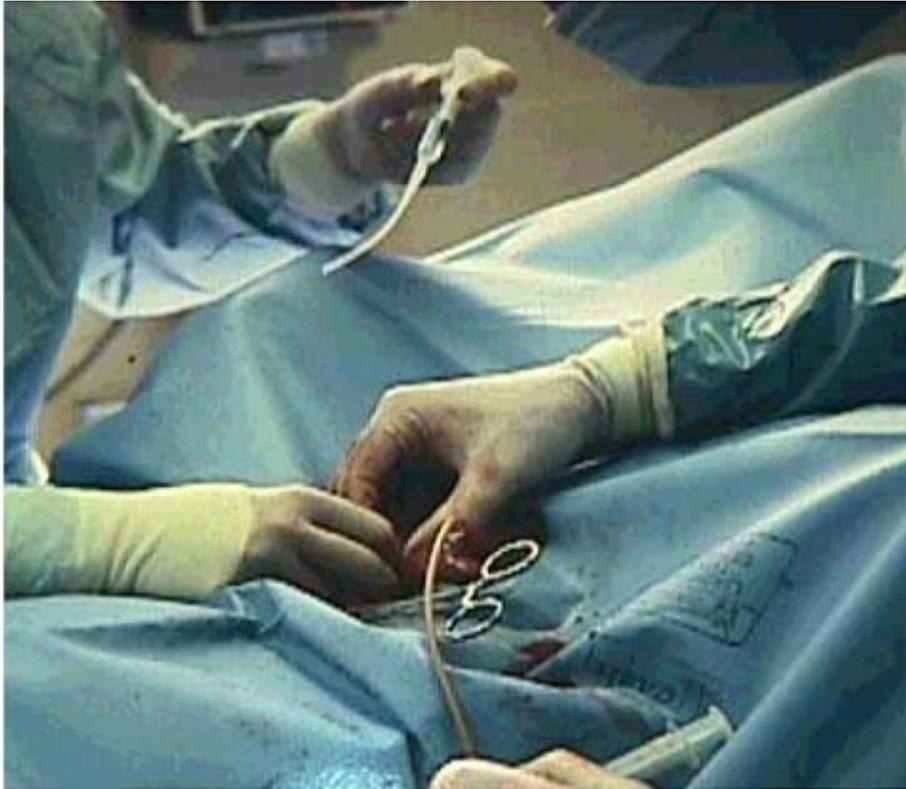
El éxito de la recogida de embriones depende no solo de edad de los embriones, también de la técnica, habilidad del técnico y otros factores incontrolables e impredecibles, tales como folículos anovulados, ovario agrandado y el exceso de ovulaciones. Tasa de recuperación usando tecnología de laparoscopia es de aproximadamente del 75-80% (Nellenschule y Niemann 1992.)

Bonino y col., (1989). Recuperaron embriones en una tasa del 70% mediante lavado de oviductos por vía quirúrgica laparoscópica, tres días después de la inseminación intrauterina. Ver figura 9.

### **Manipulación y Evaluación de los embriones**

Herman, y col., (1994), mencionan que la manipulación de los embriones inicia en el momento que se recuperan, los embriones deben ser manejados con técnicas estériles. Deben ser observados en un microscopio de disección, ser lavados 3 veces en el medio estéril y después ser evaluados para su transferencia. Estos deben ser aspirados con una micropipeta en un volumen muy pequeño del medio fresco. Es importante manejar los embriones suavemente puesto que se dañan fácilmente. La localización, manipulación y evaluación se deben lograr lo más rápidamente posible para volver los embriones a un ambiente estable de cultivo.

Figura No 9. Recuperación de embriones con la ayuda de una laparoscopia.



Fuente: Stellflug, (1998)

### **Micromanipulación y aislamiento**

Los embriones pueden ser localizados bajo un microscopio estereoscópico de magnitud entre 10 y 12 aumentos (para su evaluación se utiliza de 40 a 50 aumentos). La búsqueda embrionaria en las cajas de Petri se efectúa en forma rápida y ordenada. Se utiliza una jeringa para insulina con una aguja de calibre 22x32 ó 20x32 para mover los detritus y encontrar los embriones ocultos entre ellos, así como en las orillas de las cajas. Al ser localizado se extrae a través de una pipeta Pasteur con la punta previamente redondeada y depositarlos en cajas de Petri de 35x10 (caja de mantenimiento). Después de ser colocado en la caja de Petri se reúnen en el centro de la caja, teniendo cuidado de no dejar embriones en la orilla de la misma. Los embriones transferibles se separan por su estadio y calidad para la su transferencia en fresco o congelación. Y como se dijo anteriormente la evaluación se efectúa bajo el microscopio estereoscópico con aumento de 40 a 50x (Herman, y col., 1994).

Los microorganismos pueden ser controlados hasta cierto punto con frecuencia colocando los embriones en el medio estéril fresco. Los embriones deben ser almacenados en envases de volumen pequeño (menos de 5 ml). Los tubos de ensayo pequeños tapados funcionan bien aunque deben ser vaciados en otro envase para localizar el embrión. El medio puede ser cubierto con una capa delgada de aceite de parafina para prevenir la evaporación interna, reducir la contaminación bacteriana y para regular la tasa de intercambio de gas entre el medio y la atmósfera (Hafez, 1980; Noriega y col., 1995).

### **Crioconservación.**

El objetivo de la crioconservación es la interrupción del metabolismo celular por un tiempo determinado arbitrariamente, durante el que los embriones se mantienen en una anabiosis artificial. La actividad metabólica de los embriones conservados y almacenados en nitrógeno líquido (-196°C) es prácticamente cero puesto que a esas temperaturas no es posible ningún movimiento molecular. (Herman, y col., 1994).

### **Almacenamiento a corto plazo.**

Brackett, y col., (1988), recomiendan que los recipientes con la solución resultante del lavado de embriones se mantengan a temperatura ambiente hasta el aislamiento de los mismos. Aunque los embriones son relativamente resistentes a la temperatura en caso de una bajada de la misma, no se debe superar bajo ningún momento una temperatura de menos de 20° C, en el medio ambiente. Se han obtenido tasa similares de preñez cuando los embriones son almacenados a 37°C o a la temperatura ambiente entre la colección y la transferencia, aunque existe la sugerencia que a 37°C es mejor para embriones menos desarrollados.

Para el almacenaje a corto plazo estos pueden ser conservados en envases cubiertos o en incubadora a una temperatura de 37° C, durante uno o dos días en medio bufferado salino; y se requieren para dos o tres días más se deben de mantener a una temperatura debajo de 10°C, (Amoah y Gelaye, 1988).

### **Almacenamiento a largo plazo.**

Para su congelación a largo plazo se requiere añadir 10% de Glicerol a la solución salina para que proteja al embrión durante el proceso de congelación. Una vez que el embrión se encuentra en la pajilla previamente identificada y con la ayuda de un congelador manual o congeladora computarizada, se enfría lentamente hasta siete grados bajo cero, a una velocidad de un grado por minuto. Y se mantiene a esta temperatura durante cinco minutos, después se procede a la cristalización de forma manual con una pinza de disección previamente sumergida en nitrógeno líquido o automáticamente mediante un programa moderno de congelación; la temperatura final de congelación es de (-35°C) y se alcanza más o menos en una hora, en la que finalmente se introducen las pajuelas en nitrógeno líquido a (-196°C) donde podrán ser almacenados hasta ser descongelados. (Noriega, y col., 1995).

La descongelación es parecida a la forma de descongelación se semen, colocando las pajillas en baño maría a (37°C) durante 20 segundos, posteriormente se extrae el embrión de la pajilla y, observando al microscopio, se pasa por varias soluciones con concentraciones decrecientes de un azúcar (zucarosa) para retirar el glicerol que se le pone antes de congelarlo, después se procede nuevamente a evaluarlo y se transfieren. (Asprón, 1992).

### **Medio de lavados**

La cantidad de los medio de lavado varían de acuerdo al tamaño de los cuernos. Estos medios sirven como nutrientes para los embriones, ya que son fuente de proteínas. Los mas utilizados son Dubelcco-BSA (albúmina de suero bovino); SFB (suero fetal bovino); PBS (fosfato bufferado salino de Dubelcco), Glicerol. Generalmente se utiliza el suero fetal bovino para todas las especies. Sus presentaciones del PBS en el mercado son: Solución líquida y en polvo, presentación en sobres que contienen las sales fáciles de reconstituir.

#### Fórmula para la preparación de 10 litros de PBS

Sustancia	Cantidad
CaCl <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O	1.32

MgSO <sub>4</sub> +7H <sub>2</sub> O	1.21 g
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Glucosa	10 g
Sulfato de estreptomicina	0.5 g
Piruvato de sodio	0.36 g
Penicilina G sódica	1'000,000 UI/ 10 litros
Rojo fenol	50 mg/10 litros

(Noriega, y col.,1995).

**El medio de lavado debe reunir las siguientes características para su uso**

Temperatura: Ideal es 37.5 °C, que es la temperatura corporal de la donadora, el embrión soporta temperaturas de 25° a 37°C, sin que sufran cambios irreversibles, (Sorensen, 1982)

Ph: El óptimo de los embriones es de 7.2 a 7.6, por lo que debe tener esta característica

Osmolaridad: La requerida es de 270 a 310 miliosmoles por Kg, las variaciones causan daños irreversibles (Brackett, y col., 1988).

Atóxicos. Este deberá estar libre de compuestos químicos u orgánicos.

Esterilidad: Libres de microorganismos, los embriones toleran y se desarrollan en presencia de bacterias, pero el porcentajes de gestaciones se ve seriamente afectado.

Nutrientes: Se adicionan proteínas provenientes del Suero Fetal Bovino (SFB) o de la Albúmina Sérica Bovina (BSA), aunque también el suero homólogo.

Antibióticos y antimicóticos: Se adiciona penicilina G sódica Procaínica, estreptomicina y algún antimicótico.

(Noriega y col., 1995)

## **Criterios para la evaluación de los embriones**

La calidad de los embriones es muy importante y determinante en el éxito de la transferencia. Las características morfológicas se correlacionan muy bien con los porcentajes de gestación. Las características para evaluar los embriones, incluyen color, número y densidad de células, tamaño del espacio perivitelino. Un embrión ideal es compacto y esférico con células de igual tamaño, color y textura uniforme. Los embriones deformes son anormales; estos deben ser redondos y turgentes, con la zona pelúcida intacta y en el estado normal de desarrollo que les corresponde, según su edad (Herman, y col., 1994).

Según Amoah y Gelaye, (1988) se consideran embriones normales si los blastómeros son uniformes de tamaño y se distribuyen regularmente dentro de la zona pelúcida. Además de que su calidad es determinada por la etapa de desarrollo, integridad de la zona pelúcida, naturaleza de la capa que rodea al embrión, color y textura del citoplasma embrionario.

Por otro lado Buschbeck, (2001), dice que los embriones con una excelente calidad deben tener un color ámbar característico, los embriones con una calidad buena presentan un color mas oscuro pero uniforme. La presencia de manchas claras y oscuras o cuando el embrión es muy claro indican la existencia de vesículas, que se asocian con problemas metabólicos; estos se localizan en embriones de estadios como blastocistos tempranos y maduros. El número de células (blastómeros) es muy importante, un embrión con menos de 30 células para el día 7° es un embrión no transferible.

La compactación de células. Cuando los blastómeros del embrión están compactos y presentan una forma poligonal es por que están apretados entre ellos, dando al embrión una apariencia de mora. Además presentan un tamaño uniforme y simétrico, (Seidel, 1978; Sugie, 1970) citados por (Hafez, 1980).

Según Sorensen, (1982), los embriones extraídos del oviducto, contienen de 2 a 64 células, según el momento en que se hizo el lavado a partir de la ovulación. Los que se recolectan del útero, varían desde 64 células hasta la fase de blástula. El estadio de desarrollo de acuerdo a la edad tiene mucho que ver en la evaluación de los embriones. Para embriones de 6 días de edad, habrá mórulas

compactas, blastocistos jóvenes y maduros. En la tabla 5, se puede ver el números de células de los embriones según su edad.

No todos los embriones recuperados son transferibles y capaces de producir preñez, por lo que no tiene sentido usar buenas receptoras para llevar embriones de calidad pobre. Los embriones son calificados basándose en su estadio de desarrollo (estadio de desarrollo que deben ser de 6 días después de la inseminación) y de su calidad (Brackett, y col., 1988).

Tabla: 5. Etapa de desarrollo embrionario en la oveja.

Días después de la ovulación	Número de células
0 – 1	1 célula
0 – 1	2 célula
1 – 2	4 célula
2 – 3	8 célula
2 – 4	Mórula temprana (>16 células)
4 – 5	Mórula compacta ( 32 a 64 células)
5 – 6	Blastocisto temprano (160 células)
6 – 7	Blastocisto
7 – 8	Blastocisto expandido (200 células)
8 - 9	Blastocisto eclosionado (>200)

Fuente: (Hafez 1980).

La calidad es afectada por la cantidad del daño físico encontrado, degenerados algunos otros y dañados por procedimientos de manipulación. La realización de una minuciosa evaluación de la calidad embrionaria es de fundamental importancia para el éxito de transferencia. Es así que embriones clasificados como excelentes o buenos tienen una alta probabilidad de alcanzar preñez. No obstante, debe considerarse que embriones calificados excelentes luego de ser transferidos normalmente, no terminan en preñez, mientras que embriones de buena calidad y transferidos con algún tipo de problema tienen resultados excelentes de preñez y nacimientos normales (Cutini y col., 2000).

## **Clasificación de los embriones de acuerdo a su calidad**

Aspron, (1992), menciona que los embriones transferibles son muy parecidos entre sí, pero pueden tener ciertas diferencias en su desarrollo y en sus características morfológicas. Generalmente cerca del 80% de embriones recuperados están en la etapa correcta de desarrollo y son de aceptable calidad. La razón más común para clasificar embriones no transferible es encontrar óvulos no fertilizados. En algunos casos pocos de los óvulos pueden resultar no fertilizados. En otros casos ninguno puede ser fertilizados (Sorensen, 1982). La falta de fertilización es uno de los casos mas comunes que causan fracasos de un programa de TE.

La sociedad internacional de transferencia de embriones las clasifica en cuatro etapas que son las siguientes:

Calidad 1. Excelente. Embrión compacto, esférico, desarrollo adecuado a su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares, sin blastómeros extruidos y color ámbar uniforme, esto no tienen ningún defecto.

Calidad 2. Bueno. Compacto, poco irregular, desarrollo adecuado a su edad, presencia de vesículas pero no abundantes, con algunos blastómeros extruidos, pocos desechos celulares, color uniforme (quizás pocas zonas oscuras y claras); es decir con defectos leves.

Calidad 3. Regular. Descompactación marcada, desechos celulares, blastómeros extruidos, presencia de vesículas, masa pequeña no menor del 50% de lo normal. Estos embriones de preferencia se transfieren en frescos, ya que no soportan la congelación, con defectos mayores pero aptos para ser transferidos.

Calidad 4. No transferibles. Son de marcada degeneración, masa pequeña menor del 50% de lo normal, descompactación, retraso en el desarrollo (mas de dos días), color oscuro, zonas claras y oscuras e irregularidades en los blastómeros.

Los embriones de calidad 1 y 2 pueden ser congelados, ya que los de calidad 3 no resisten la congelación, (Hafez, 1980).

## **Descripción de estadios de desarrollo del embrión**

Desde que el óvulo es fecundado, este presenta varios cambios morfológicos a través de su desarrollo, a estos cambios se le denomina estadios de desarrollo embrionario, que a continuación se describen:

- a) Mórula temprana. Agrupación de células que tienden a ser esféricas, que se observan blastómeros individualmente. La masa celular ocupa el 80% del espacio perivitelino.
- b) Mórula madura. Su compactación celular, blastómeros de forma poligonal es característica principal. Posee células esféricas en la periferia de la agrupación celular.
- c) Blastocisto temprano. Embrión de fase mórula compacta, que tienen un fluido en la cavidad interna, tienen una apariencia de anillo y ocupa el 70% al 80% del espacio perivitelino, el fluido abarca menos del 50% de la masa celular del embrión.
- d) Blastocisto maduro. Se caracteriza por una pronunciada diferencia entre las células del trofoblasto alargado en el embrión, y el disco embrionario que es una masa muy pequeña de color muy oscuro y más compacta. El blastocelo abarca más del 50% del embrión y el embrión abarca el 90% del espacio perivitelino.
- e) Blastocisto expandido. Se caracteriza por el aumento del diámetro del embrión así como el adelgazamiento de la zona pelúcida. Y el embrión ocupa el 100% del espacio perivitelino.
- f) Blastocisto en eclosión. En la fase de desarrollo, el embrión presenta ruptura en la zona pelúcida por donde eclosiona paulatinamente hasta salir totalmente de ella. El embrión puede tener la forma esférica de un blastocisto expandido o estar colapsado.

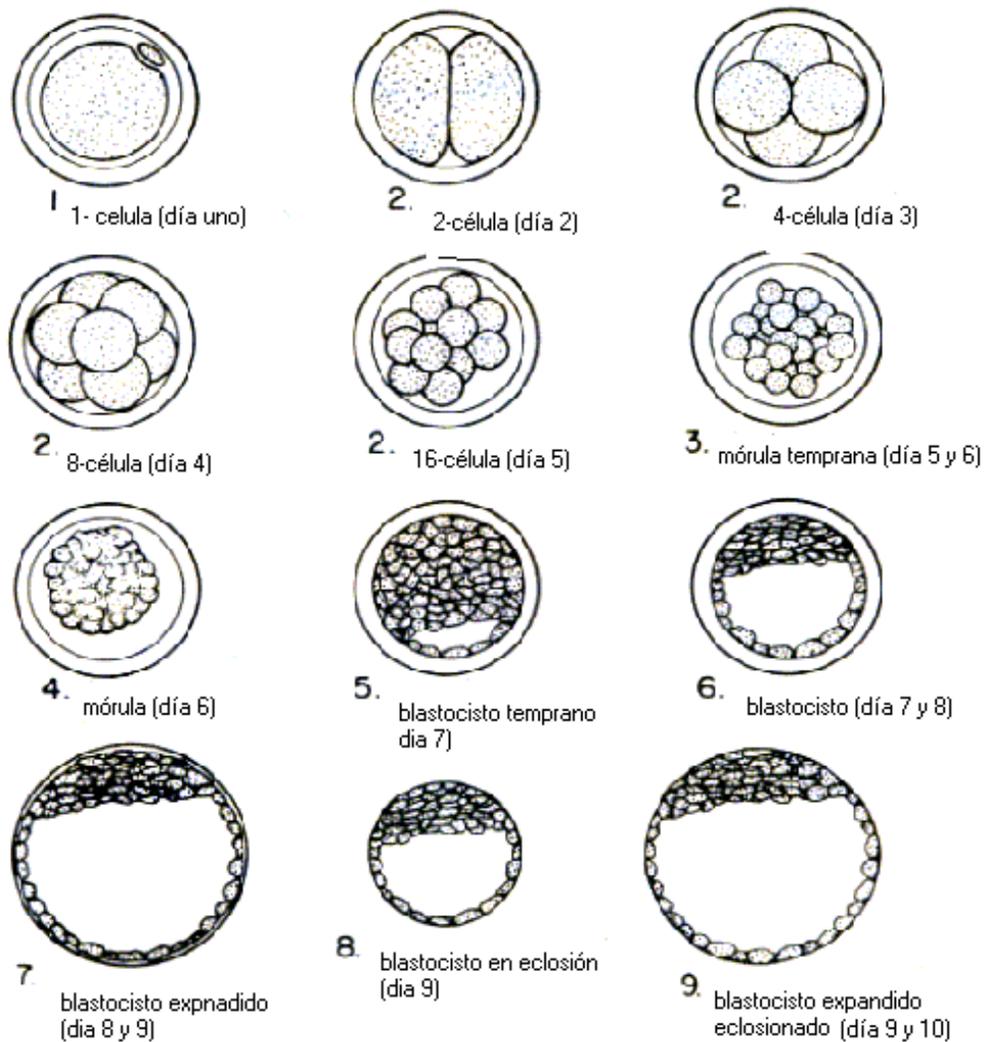
En la figura 10, podemos observar el número de células que contienen en cada una de las etapas de desarrollo así como su morfología.

(Noriega y col., 1995).

## Transferencia del embrión

La transferencia de embriones es una técnica para el mejoramiento genético del ganado, consiste en provocar que un animal donador, mediante un tratamiento hormonal e inseminación del alto valor genético, produzca varios embriones en la que 6-7 días después le son extraídos para ser transferidos a

Figura No 10. Morfología de desarrollo de acuerdo a la edad embrionaria a partir de la primera inseminación.



Fuente: Buschbeck, (2001).

hembras de menor valor genético (receptoras), que previamente fueron sincronizadas con el calor de las donadoras, para que estas desarrollen hasta el parto y sean las madres adoptivas de las crías hasta el momento de destete, adaptándolas al medio ambiente (Henríquez y García 1998; Aspron, 1992)

### **Medidas de higiene antes de la transferencia**

Para la organización y desarrollo de programas de transferencia de embriones, es necesario realizar el proceso en un área limpia y otra en corrales. En la que incluye manejo de animales, recogida de embriones y su transferencia; mientras que en la siguiente implica las operaciones con los embriones. Es necesario la limpieza y desinfección de aparatos reutilizables tal como: sondas de lavado, catéter de transferencia, artículos de plástico y de cristal, la que comienza con un lavado exhaustivo. (Kunkel, 1992).

### **Métodos de transferencia**

#### **Laparotomía**

La transferencia quirúrgica se realiza a través de una incisión en la línea media ventral. El tamaño de la incisión será suficiente con que permita la introducción de una mano en la cavidad abdominal para poder exponer la punta del cuerno uterino. En la oveja el tracto genital únicamente se puede abordar quirúrgicamente, para la transferencia de embriones, mediante la laparotomía media, con anestesia general y a través de una incisión en la línea media del abdomen con anestesia local. El abordaje en la línea media puede ser menos traumática para el tracto genital y permite una mejor exposición. Cuando el tracto de las receptoras ha sido expuesto, se determina la presencia de un cuerpo lúteo sobre los ovarios, para poder realizar la transferencia. Se selecciona un embrión bajo el microscopio y se le recoge con una pipeta Pasteur o un tubo capilar de vidrio. El cuerno es punzado con una aguja y el embrión, que se encuentra en el capilar con el medio de cultivo, es depositado en el lumen del útero cuidadosamente. Una vez repuesta la matriz a su localización natural se satura la herida operatoria (Sorensen, 1982).

Sin embargo la laparotomía puede ser auxiliada con laparoscopia, en la que el laparoscopio se pone con la pared abdominal y los ovarios son examinados para evidenciar uno o mas cuerpos lúteos. Generalmente en las receptoras (ovejas y cabras) se observa mas de un cuerpo lúteo. Si se identifica un CL normal, una incisión pequeña se realiza en la línea media del abdomen sobre la ubre. La extremidad del cuerno uterino que corresponde al ovario que lleva el CL se extrae. Un catéter fino se utiliza para transferir los embriones en el cuerno uterino. Finalmente el cuerno uterino es devuelto al abdomen y las incisiones pequeñas se cierran. Luego se aplica una inyección temporal de penicilina o tetraciclina, para evitar infecciones. (Buschbeck, 2001).

### **Laparoscopia**

Buschbeck,( 2001). Actualmente la mayoría de las transferencia se realizan a través de Laparoscopia, en una manera similar a las usadas en la inseminación artificial. En la que se realizan pequeñas incisiones en la línea media del abdomen para que los instrumentos de transferencia se puedan introducir a través de la cavidad peritoneal. A través de dos incisiones los instrumentos quirúrgicos se insertan (cánula y trocánteres) en la pared del cuerpo en la cavidad peritoneal de la oveja, en la que se infla con CO2 para facilitar el trabajo, después estos instrumento se sustituyen por un laparoscopio (fuente de luz, que permitirá ver a través de este, para localizar la zona reproductiva. Una vez localizada se procede a depositar el embrión con una jeringa a través de la otra incisión de la línea media. Ver figura 11.

En la mayoría de los casos la recuperación post-operatoria es rápida (Aspinall, 1999; Stellflug, 1998).

Las transferencias de embriones en ovinos por este método, pueden depositarse en el oviducto o en el útero. El sitio de transferencia de los embriones de un etapa mayor de 8 células en el útero o el oviducto no demuestra ninguna diferencia significativa en la supervivencia del embrión, (Eppleston, 1982; Wannes y col., 1982 citados por (Amoah y Gelaye 1988). Ver figura 12.

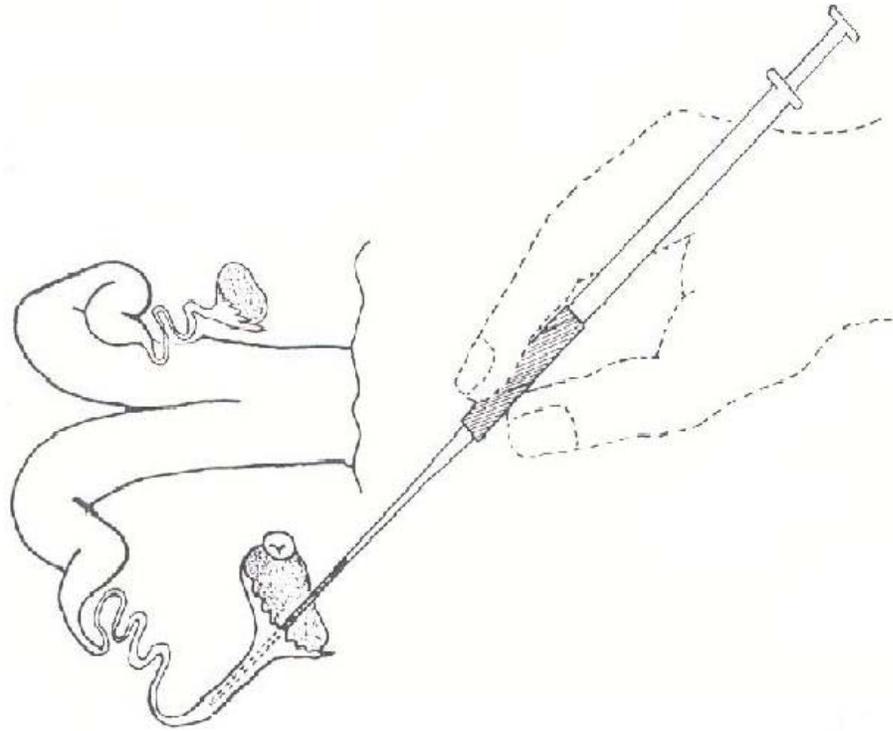
Los porcentajes de éxito con embriones transferidos al oviducto (uno a tres días después del celo) son generalmente menores que los porcentajes conseguidos con embriones de mayor edad, transferidos al útero. (Armstrong y Gareth, 1983), sin embargo en una comparación de sitios de transferencia (oviducto vs útero), no se encontró diferencia significativas en la supervivencia que pudiera ser atribuida al sitio de transferencia, 40% vs 47.5% de supervivencia de embriones. La supervivencia de los embriones transferidos como gemelos son perceptiblemente mas alto cuando ambos embriones son transferidos al mismo oviducto que cuando se transfieren uno a cada oviducto. Por lo regular en todos los casos dos embriones son transferidos en cada receptora.

Figura No 11. Técnica de transferencia vía laparoscopia.

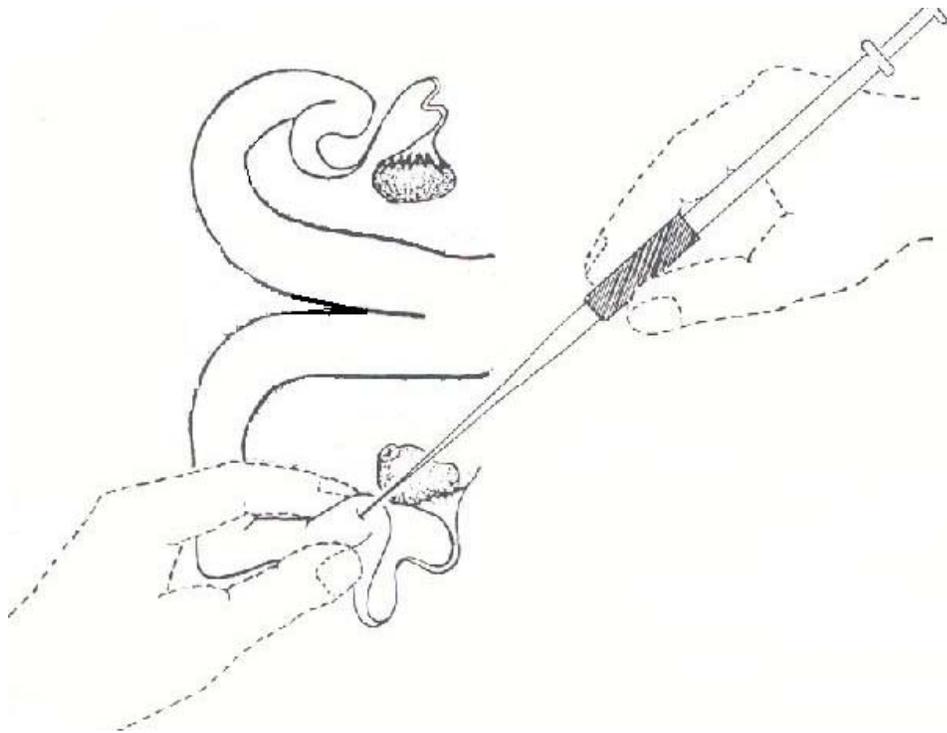


Fuente: Buschbeck,( 2001).

Figura No 12. Ubicación de deposición del embrión. A, transferencia en el oviducto; B, transferencia en el cuerno uterino.



A



B

Hafez, (1980).

Armstrong y Gareth, (1983), indican que si la sincronización es apropiada en las recipientes el momento de la transferencia, no afecta la supervivencia de los embriones después de transferir dos embriones, además indican que existe una mejor significancia cuando se transfieren dos embriones mas bien que uno o tres. Las tasas de preñez esperada a través de un buen manejo de las receptoras que se les transfieren de dos a tres embriones frescos es del 70% y 60% para embriones congelados.

Por lo general los embriones de menos de 8 células pueden ser transferidos al oviducto. Embriones muy jóvenes son especialmente susceptibles al daño del útero, posiblemente por las secreciones uterinas tóxicas. Embriones con mas de 8 células pueden ser transferidos al cuerno uterino, (Britt, 1974; Roche, 1976) citados por (Hafez, 1980).

La selección de los embriones en el estado idóneo de desarrollo y aspecto, aumenta intensamente los porcentajes de gestación. Los porcentajes de gestación del 44 y 53% respectivamente corresponden a mórula y mórula avanzada, comparados con el 65, 66 y 64% con blastocistos jóvenes y avanzados. En la tabla 6, se puede observar que los porcentajes son mayores en la etapa de blastocistos. (Wright, 1981; citado por Brackett, y col., 1988). La mayoría de las transferencias se realizan entre el 5° y 8° día después del servicio (Sorensen, 1982).

Generalmente las tasas de preñez son mas altas con los embriones frescos que con embriones congelados de una etapa similar de desarrollo. Los pasos implicados de congelación pueden dar lugar a la destrucción de algunas células del embrión y pueden reducir la capacidad del embrión en convertirse normalmente. La tasa de partos esperada por embriones transferidos de buena calidad es de aproximadamente del 60-70% para embriones frescos y del 50-60% para embriones congelados (Aspinall, 1999).

Los promedios esperados en un programa de transferencia de embriones en ovejas son observadas en la tabla 7.

Tabla: 6. Efecto de la etapa de desarrollo de embriones ovinos sobre la supervivencia después de transferidos.

Etapa	No. De embriones transferidos	No. De corderos nacidos	% de supervivencia de embriones
2 a 4 células	10	0	0%
5 a 8 células	93	26	28%
9 a 16 células	98	39	39.8%
Mórulas	49	14	28.6%
Blastocistos	14	7	50%

Fuente: Armstrong y Gareth (1983).

Tabla 7. Promedios esperados en un programa de transferencia de embriones.

	Promedios.	Rangos.
Respuesta superovulatoria	12 CL's	0-30
Eficiencia en colección de embriones	8 embriones	60-95%
Transferencia de embrión	6 embriones	0-30
Supervivencia de embriones (nacimientos)	70%	0-100%
Recipientes preñadas	60%	0-100%

Fuente: McOnie, y col., (1992).

### **Factores que afectan el resultado de Transferencia de embriones**

Los resultados de un programa de TE varían grandemente. Algunos programas fracasan completamente mientras que otros resultan exitosos. Alrededor del 25% de las donadoras fracasa la respuesta de superovulación. Algunos de estos podrían fallar de nuevo en la respuesta, cuando se repiten; otros podrían responder normalmente. Esta alta variabilidad en los resultados siempre ocurren en programas de TE en el ganado y es una prioridad de muchos programas de investigación.

Dentro de estos factores están las siguientes:

Efecto secundario de las gonadotropinas: Los niveles de hormonas en la sangre de las donadoras es anormal debido al gran número de folículos activados en los ovarios por la alta superovulación por las drogas.

Ryan, y col., (1991), encontraron un porcentaje de embriones recuperados, en la que la fertilización y crecimiento generalmente eran declinantes relacionados con el incremento en la incidencia de muchos folículos como resultado del incremento en las dosis de gonadotropina (PMSG y FSH-P). Estas hormonas alteran la señal de signos de calor y pueden afectar el transporte del semen a través del cérvix al sitio de fertilización. Hay una fuerte relación entre el éxito de superovulación y el fracaso de la fertilización: donadoras que exitosamente producen muchos cuerpos lúteos (20 o mas) tienen un alta proporción de aquellos como no fertilizados.

El incremento de la dosis superovulatoria de PMSG está asociada con un aumento de folículos grandes, lo que se traduce en una disminución de la tasa ovulatoria, lo que se atribuye al prolongado periodo de la presencia de gonadotropina. Esto a la vez puede ser detrimental para la fertilización y desarrollo de embriones in vivo (Ryan, y col., 1991).

Raza donadora: Las razas prolíficas responden mejor a las drogas de superovualción. (McOnie, y col., 1992).

Edad de la donadora: Donadoras jóvenes o viejas generalmente producen pocos embriones (McOnie, y col., 1992).

Estación: Esto depende generalmente de la región en que se encuentren. Sin embargo la literatura indica que para ovejas superovuladas no se han encontrado efectos significantes como lo afirma (Greaney, y col., 1997).

Stress: La tensión reduce la fertilidad, como resultado el programa de TE. El tiempo que mas seriamente afecta el estrés es en la gestación de la donadora, el momento de estros de la receptora, y las primeras dos semanas siguientes de la TE en la receptora. El movimiento de la donadoras preñadas no se recomienda, sin embargo el movimiento para la TE no es afectado por el estrés; debido a que como la preñez ya se estableció y los huevos tienden a ser removidos. (McDonald, 1986.).

Condición corporal: Donadoras en particular deben tener buena condición corporal, idealmente de 3 a 3.5 en escala de 1 a 5. las receptoras también deben de estar en buenas condiciones (Buschbeck, 2001).

Dieta: Animales de buena condición no deben recibir una alimentación extra. Únicamente los animales de condición pobre podría beneficiarse. La alimentación debe enfocarse sobre la energía, no proteína. Dietas con alta proteína son asociadas con reducción de la calidad de embriones y un incremento de muerte temprana de estos en las receptoras (Aspinall, 1999).

Salud de la donadora: La TE puede ser usado para salvar la genética de donadoras afectados por una enfermedad. Sin embargo los resultados disminuyen mientras la condición corporal declina; drásticamente reduce la superovulación (Aspinall, 1999).

Programa de crianza: Normalmente se recomienda un carnero por cada 2 donadoras superovuladas. Las ovejas superovuladas que entran en calor mas temprano que lo normal dentro de las 18 a 24 horas de removido el esponja. Los machos son introducidos por 36 horas o se insemina artificialmente en este periodo (Boland, y col., 1983).

Manipulación de la droga: El manejo inadecuado de las drogas de superovulación pueden alterar su acción en el animal. Particularmente la temperatura. Los indicaciones se deben seguir de cerca, estas deben de ser administrada cada 12 horas por tres días y puede administrarse subcutáneamente (entre la grasa y la piel) (Cutini y col., 2000)

Numero de embriones transferidos: Las tasas de supervivencia de embriones son altas cuando 2 o 3 embriones (en contraste con uno) son transferidos a cada receptoras. (Armstrong y Gareth 1983; Cutini y col., 2000).

Selección y cuidados de receptoras: Seleccionar una buena receptora es llevarnos al éxito. Es un error creer que cualquier oveja vieja podría desempeñarla. Las receptoras deben ser jóvenes (2-4 años), probado reproductivamente, buenas condiciones, y salud. Ya que estas son las que hacen todo el trabajo de aceptar los embriones y llevarlos a la preñez. Estas deben de estar libre de enfermedades, de tensión que asegure el nacimiento de cría limpio (Cutini y col. 2000).

### **Ventajas de la transferencia de embriones**

1. Genética. Permite aumentar la proporción de un a hato derivada de hembras genéticamente superiores.
2. Bio-seguridad. Los aspectos biológicos específicos de embriones, combinados con procedimientos especiales de manejo en el proceso y de empaquetado reducen el riesgo de transmisión de enfermedades, tanto nacional e internacional.
3. Traslado del material genético. Los costos de envío, son mucho mas bajo para los embriones que para los animales.
4. Recuperación del material genético. Animales que por enfermedad o edad avanzada ya no son capaces de producir una cría.
5. Almacenaje del material genético. A través del congelamiento de embriones se pueden tener crías de animales que ya estén muertos (McOnie, y col., 1992).

### **Desventajas**

1. Requiere de una inversión inicial debido al alto costo de las hormonas, equipo y mano de obra, así como alimentación de donadoras y receptoras antes y después de la transferencia de embriones.
2. El procedimiento está constituido por que deben realizarse a la perfección para lograr buenos resultados por lo que se debe contar con personal capacitado.
3. La principal desventaja es la imposibilidad para predecir los resultados, ya que hay mucha variación en la producción de embriones por cada donadora; además de que una falla pequeña en el proceso reduce drásticamente el porcentaje de gestación (Aspron, 1992; Hafez, 1980).

### **Preñez y porcentaje de partos**

Generalmente, transfiriendo buena calidad de embriones frescos en receptoras muy buenas debe resultar en una tasa de preñez aproximadamente 70%, sin embargo esto se puede extender hasta el 100% o muy abajo del 70%. (Buschbeck, 2001).

El efecto que puede llegar a tener el estadio de desarrollo embrionario sobre los porcentajes de preñez es un factor que ha sido estudiado por diversos autores con resultados diferentes.

Cutini y col., (2000), encontraron que los porcentajes de preñez para embriones frescos producidos in vivo y transferidos en estadio de mórula han sido muy variables oscilando entre 48 y 70%. Cuando se transfieren blastocistos los porcentajes han sido del 65-70%. Para embriones producidos in vivo y congelados, los porcentajes de preñez fueron del 40% para mórulas y blastocistos tempranos, disminuyendo en un 27% para blastocistos y blastocistos expandidos.

### III. CONCLUSIONES

Con esta información recopilada se puede concluir que la transferencia de embriones es una técnica biotecnológica que estriba en la multiplicación masiva en animales de alto valor genético en un tiempo muy rápido. Generalmente de la forma natural se puede obtener 1 o 2 crías por año; sin embargo con esta técnica se pueden obtener de 10 a 15 crías o hasta 20 crías por año. El desarrollo de esta biotecnología ha adquirido mayor preponderancia sobre todo en ganado bovino por su gran potencial económico tanto en la producción de carne como en leche. Y por la problemática que se ha presentado su demanda en los mercados, se ha visto obligado a incrementar su producción.

Esta herramienta en México ha adquirido mayor importancia y ya se practica a nivel comercial. Actualmente la transferencia de embriones es una poderosa herramienta de reproducción y genética para incrementar la población de animales. El escaso nivel técnico que priva en la mayoría de los ganaderos, salvo excepciones, hace difícil la introducción de nuevas tecnologías de la reproducción, sobretodo en ovinos y caprinos, especies en las cuales se aprecia un retraso tecnológico. En México, ambas especies han recuperado cierta importancia debido a que la demanda ha superado ampliamente a la oferta, provocando una disminución de pie de cría. Sin embargo, actualmente la presentación de enfermedades obliga a reconsiderar la necesidad de importar animales en pie o en canal, con todos los riesgos que ello conlleva y que requiere de un mayor cuidado y control. En este sentido, la falta de promoción de estas especies, hace necesaria una nueva dinámica que incluya una nueva generación y aplicación de conocimientos en todas las áreas implicadas en la producción. Dentro de todas ellas, las técnicas modernas de reproducción asistida como la transferencia de embriones cobran especial interés, debido a que permiten acortar los intervalos entre generaciones e introducir elementos de mejoramiento que conducen a una mayor eficiencia en la producción.

#### IV. LITERATURA CITADA

- Aguilar, J. J., 2001. Bases de la reproducción animal. [www.produccionbovina.com/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial](http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial). (febrero, 2003)
- Allen, R.L., Bondioli, K.R. and Wright, R.W. Jr. 1982. induction of estrus and superovulation in seasonally anestrous ewes. *Theriogenology* 17: 74 (Abstr. 1)
- Amoah, A. E., Gelaye, S. 1988. Recuperación, evaluación, almacenaje y transferencia de embriones en cabras. Centro de investigación agrícola. [www. ag. Fvsu.edu/html/publications/GoatCenter/amoah1.htm](http://www.ag.fvsu.edu/html/publications/GoatCenter/amoah1.htm). (febrero,2003)
- Armstrong. D. T. and Gareth, E. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 19:31-43
- Asprón, P. M. A. 1992 ¿Que es la transferencia de embriones. [www.patrocipes.uson..mx/patrocipes/invpec/ranchos/RA0062.html](http://www.patrocipes.uson.mx/patrocipes/invpec/ranchos/RA0062.html). (enero, 2003)
- Aspinall, J. 1999. Animal breeding services for Sheep and Cows. [www.genetic.gains.co.nz/index.htm](http://www.genetic.gains.co.nz/index.htm). (febrero, 2003)
- Brackett, G. B., Seidel, . E. G., Seidel, M. S., 1988. Avances de zootecnia. Nuevas técnicas de reproducción animal. Primera edición. Editorial Acribia, Zaragoza España. pp. 47-89
- Bearden, H. J., Fuquay, W. J. 1982. Reproducción animal aplicada. Editorial: el manual moderno, México, D.F. pp. 202
- Boland, M. P., Crosby, T. F. and Gordon, I. 1983. Factors influencing the superovulatory response in sheep. *Theriogenology*. 19: 114 (Abstr. 1)
- Buckrell, B. 2000. Reproductive Technologies. Small Ruminant <http://www.uwex.edu/ces/animalscience/sheep/Pdf/Reproduction/Reproductive%0Technologies.pdf> (marzo, 2003)
- Boggio, D. J. C., Gatica, R., Correa, J. E.1995. Efecto de la reutilización de un dispositivo vaginal con progesterona sobre la sincronización de celos e inducción de superovulación en ovejas. [www. Portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle=140](http://www.Portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle=140) (noviembre, 2002)
- Boggio, D. J. C. 1997. Sobrevivencia in vitro de embriones congelados convencionalmente preparados para transferencia directa en 1.5 M etilenglicol. [www.portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle=102](http://www.portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle=102) (noviembre, 2002)
- Bonino, J. M., Hughes, P. 1995. Inducción de celos en ovejas Corriedale fuera de la estación sexual. [www.sul.org.uy/prod.ov.htm](http://www.sul.org.uy/prod.ov.htm). (noviembre, 2002)

- Bonino, J., Hughes, P., Villaami, A., Azarini, M., Valledor, F. 1989. Multiovulación y trasplante embrionario en ovinos. [www.sul.org.uy/prod.ov.htm](http://www.sul.org.uy/prod.ov.htm). (noviembre, 2002)
- Buschbeck, C. 2001. Reproductive services and genetics for the sheep, goat and farmed deer industries. <http://www.srgenetics.com/et.htm> (noviembre, 2002)
- Borquez, A. J. y Cabral, L. 1997. Inseminación artificial en ovinos. [www.misionrg.com.or/insemina.htm\\_18k](http://www.misionrg.com.or/insemina.htm_18k) (Abril, 2003)
- Cutini, A., Teruel, M. y Cabodevila, J. 2000. Factores que derterminan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. <http://www.vet.unicen.edu.ar/ca.PDF>. (noviembre, 2002)
- Córdoba, I. A. G., Ruiz, L. J., Saltijeral, O. J. F., Pérez, G. 1999. Inducción y sincronización de celos en ovejas criollas anéstricas estacionales con esponjas vaginales impregnadas en FGA y PMSG inyectables. [www.uco.es/organiza/servicios/publica/haz/articulos/1999/pdf/9cordova.pdf](http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/haz/articulos/1999/pdf/9cordova.pdf). (noviembre, 2002)
- De Alba, J. 1985. Reproducción animal. Segunda edición, editorial Copilco, México. pp. 322-328
- Driancourt, M. A. and Fry, R. C. 1992. Effect of superovulation with FSH-P o PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 27: 279-292
- Derivaux, J. 1961. Fisiopatología de la reproducción e inseminación artificial de los animales domésticos. Editorial acribia, Zaragoza, España. pp. 471 - 475
- Derivaux, J. 1976. Reproducción de los animales domésticos. Editorial acribia, España. pp. 11-12
- Galina, H. G., Saltiel, C. A., Valencia, M. J. 1988. Primera edición en español, editorial Limusa, México. pp. 90-95
- Gareth, E., Maxwell., W. M. C. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Primera edición en español, editorial acribia, Zaragoza, España. pp. 66-70
- Gonzáles, D. De L. J. H. 1985. Transferencia de embriones en ganado bovino. Monografía, Lic. UAAAN, Buena vista Saltillo, Coahuila. pp. 4-5
- Greg. S. L., Hensley, E. L., Stellflug, J. N. 1999. Transcervical artificial insemination and embryo transfer in sheep [www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000010/77/0000107757.html](http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000010/77/0000107757.html). (enero, 2003)

González, B. A., Moreno, S. J., García, G. R.M., Cocero, M. J., López, S.A. 2002. La administración de protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes. [www.inia.es/iaspa/2002/vol17/gonzalez](http://www.inia.es/iaspa/2002/vol17/gonzalez). (febrero, 2003)

Greaney, K.B., McDonald, M. F., Vivanco, H. W., Tervit, H. R. 1997. Out- of season embryo transfer in five breeds of imported sheep. [www.rsnz.govt.nz/clan/nzsap/proc.html](http://www.rsnz.govt.nz/clan/nzsap/proc.html) (febrero, 2003)

Hafez, E. S. E. 1980. Reproduction in farm animals. 4° edition, pp. 546-582

Herman, A. H., Mitchell, R. J., Doak, A. G. 1994. The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. Eight edition, by interstate publisher, INC. Illinois. pp. 304-305, 208-224

Hamra, A. H., McNally, J. W., Marcek, J. M., Carlson, K, M. and Wheaton, J. E. 1989. Comparison of progesterone sponge, cronolone sponge and controlled internal drug release dispenser on fertility in anestrous ewes. Anim. Reprod. Sci. 18: 219 – 226

Hamra, A. H., Massri, J. M. and Wheaton, J. E. 1986. Plasma progesterone levels in ewes treated with progesterone-controlled internal drug-release dispensers, implants and sponge. Anim. Reprod. Sci. 11: 187 – 194

Henderson, D. C., Dowing, J. M., Beck, N. F. G. and Lees, J. L. 1984. Oestrous synchronization in ewes: A comparison of prostaglandin F<sub>2α</sub> than salt with a progestagen pessary. Anim. Prod. 39: 229 – 233

Henríquez, M. M., García, D. B. E. 1998. Mejoramiento genético mediante transplante de embriones <http://patrocipes.uson.mx/patrocipes/invpec/ranchos/RA0087.html>. (febrero, 2003)

Healey, M. C., 2002. Successful embryo transfer, Sheep and goats. <http://adv.susu.edu/~kwhite/lect28notes.html>. (febrero, 2003)

Jabbour, H. N., Gareth, E. 1991. Superovulation of merino ewes with an ovine pituitary Follicle Stimulating hormone Extract. Reprod., Fertil. Dev. 3: 561 – 569

Kunkel, J. R. 1992. Transferencia de embriones e inseminación artificial. 15/03/03. [www.inform.und.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/reproduc/Embryo-TRANSFER.html](http://www.inform.und.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/reproduc/Embryo-TRANSFER.html) (marzo, 2003)

Mutiga, E. R. and Baker, A. A. 1982. Superovulatory response in merino ewes to three PMSG dose levels. Theriogenology. 17: 100 (Abstr. 1.

McDonald, L. E. 1986. Veterinaria: Reproducción y endocrinología. 2° edición en español, editorial océano, México. pp. 279-238

Mellado, B. J. A. 1999. Fisiología de la reproducción. Curso de Lic. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila

McKusick, D.L. Thomas, R.G. Gottfredson, R.D. Zelinsky, and Y.M. Berger 1997. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes B.C. [www.uwex.edu/.../Reproduction/Transcervical%20and%20laparoscopic%20artificial%20insemination%20techniques.pdf](http://www.uwex.edu/.../Reproduction/Transcervical%20and%20laparoscopic%20artificial%20insemination%20techniques.pdf). (febrero, 2003)

McOnie, W. B., Collingwood, C., Flock, A. M. 1992. Small Ruminant ET. [www.creeksideanimalclinic.com/company.html](http://www.creeksideanimalclinic.com/company.html) - 8k (febrero, 2003)

Noriega, S. R., Martínez, B. S., Flores, C. R. 1995. Técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos. Universidad Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. pp. 57-58

Nellenschule, E. and Niemann, H. 1992. Collection and transfer of ovine embryo by laparoscopy. *Anim. Reprod. Sci.* 27: 293 – 304

Pijoan, A. P. J. J. 1983. Aspectos endocrinos en diversas fases reproductivas de las ovejas: anestro estacional. *Veterinaria, México* 14: 235-240.

Pineda, H. M., Del Campo, H. C., 1970. Fisiología de la reproducción de los animales domésticos. Primera edición, editorial austral de Chile. pp. 284-285

Ryan, J. P., Hunton, J. R., Maxwell, M. C. 1991. Increased Production of Sheep Embryos Following Superovulation of Merino Ewes with a Combination of Pregnant Mare Serum Gonadotrophin and Follicle Stimulating Hormone. *Reprod. Fertil., Dev.* 3: 551-560

Rexroad, C. E., Powell, A. M. 1991. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. *J. Anim. Sci.* 69: 246 – 251

Robinson, J. J., Wallace, M. J., Aitken, R. P. 1989. Fertilization and ovun recovery rates in superovulated ewes following cervical insemination or laparoscopic intrauterine insemination at different time after progestagen withdrawal and in one or both uterine horns. *J. Reprod. Fertil.* 87: 771 – 782

Redondo, C. P., Fernández, C. I., 2001. Aparato reproductor de la hembra. <http://157.88.160.17/web/zootecnia/%C3%BAtero.htm> (marzo, 2003)

Schoenian, S., 1999. An update on sheep artificial insemination. [www.sheepandgoat.com/ai.html](http://www.sheepandgoat.com/ai.html). (febrero,2003)

Sorensen, A. M. 1982. Reproducción animal: principios y prácticas. Primera edición en español, editorial McGraw-Hill, México. pp. 298 –382

Smidt, D. and Ellendorff, F. 1972. Endocrinología y fisiología de la reproducción de los animales zootécnicos. Primera edición en español. Editorial acribia, Zaragoza, España. pp. 311-315

Stellflug, J., 1998. Procedimientos para la colección del embrión y la transferencia de embriones. [www.hawaii.edu/ansc/Proceed/Hhl/embryo.htm](http://www.hawaii.edu/ansc/Proceed/Hhl/embryo.htm) (febrero, 2003)

Urrutia, M. J., Ochoa, C. M. A., Beltrán, L. S. 2000. Ovinocultura de agostadero en el norte de México: prácticas de manejo y mejoramiento. Editorial Universitaria Potosina, S. L. P. México. pp. 27-30

Wright, R. W. Jr., Bondioli, K., Grammer, J., Kuzan, F., and Menino, A. Jr. 1981. FSH or FSH plus LH superovulation in ewes following estrus synchronization with medroxyprogesterone acetate pessaries. *J. Anim. Sci.* 52:115-118

Wildeus, S. 1993. Techniques to Improve Reproductive Efficiency in Goats and Sheep. <http://www.vsu.edu/ext/smallruminantprogram/meatgoat/publications/index.html#sw1> (noviembre, 2002)

Zapien, S. A. 1990. Transferencia de embriones uso e impacto en la ganadería de carne y leche <http://patrocipes.uson.mx/patrocipes/invpec/reproducción/prepo.htm>. (enero, 2003)

Zarate, R. F. 2000. Ovinocaprinocultura. Curso de Lic. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila