

**EFFECTO DE UN PRIMING CON PROGESTERONA DOS DÍAS ADICIONALES EN UN
PROTOCOLO DE SUPEROVULACION CONVENCIONAL SOBRE LA RESPUESTA
EMBRIONARIA EN VACAS RAZA BLONDE D'AQUITAINE.**

JHONATAN CASTAÑO GUTIERREZ

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGA
2016

**EFFECTO DE UN PRIMING CON PROGESTERONA DOS DÍAS ADICIONALES EN UN
PROTOCOLO DE SUPEROVULACION CONVENCIONAL SOBRE LA RESPUESTA
EMBRIONARIA EN VACAS RAZA BLONDE D'AQUITAINE.**

JHONATAN CASTAÑO GUTIERREZ

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE:
ZOOTECNISTA

DIRECTOR:
IVAN MAURICIO GONZALES FAJARDO.MVZ. Sp.

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGA
2016

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

DEDICATORIA

A Dios por estar siempre presente en las decisiones que he tomado en mi vida, por mostrarme el camino y por abrirme las puertas hacia proyectos y anhelos que siempre he tenido

Dedico este trabajo especialmente a mi familia y a su incondicional apoyo durante todo el proceso de formación profesional y en las últimas etapas de este.

A la universidad de Cundinamarca por ser mi alma mater y contribuir sustancialmente durante estos últimos años en mi proceso de formación como profesional.

A todas las personas pertenecientes al grupo de trabajo de CGR Biotecnología reproductiva que contribuyeron y permitieron el desarrollo de este trabajo y aportaron a mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mi madre por su total apoyo incondicional desde que tengo memoria, por apoyarme y estar siempre presente en todas las decisiones que he tomado y por ser mi pilar en la vida.

A mi padre por permitirme alcanzar mi desarrollo profesional, y apoyarme en mis sueños desde siempre.

Al Doctor Iván Mauricio Gonzales Fajardo por ser un gran tutor y ser la persona mediante la cual se ha podido desarrollar a plenitud este trabajo de grado, persona íntegra y trabajadora.

A la Doctora Vilma Moreno Melo por haber sido parte fundamental en mi desarrollo profesional y haber contribuido sustancialmente en la última etapa de mi carrera universitaria.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pag. |
|---|------|
| 1.RESUMEN | 11 |
| 2.INTRODUCCION | 12 |
| 3.HIPOTESIS | 14 |
| 4.OBEJTIVOS | 15 |
| 4.1. OBJETIVO GENETRAL | 15 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS | 15 |
| 5.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 16 |
| 6.JUSTIFICACION | 17 |
| 7.MARCO TEORICO | 18 |
| 7.1. FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA BOVINA | 18 |
| 7.1.1. Ciclo estral bovino | 18 |
| 7.1.1.1. Proestro | 18 |
| 7.1.1.2. Estro | 19 |
| 7.1.1.3. Metaestro | 19 |
| 7.1.1.4. diestro | 19 |
| 7.1.2. Control endocrinológico del ciclo estral | 20 |
| 7.1.2.1. Hipotálamo | 21 |
| 7.1.2.2. Hipófisis | 22 |
| 7.1.2.3. Ovarios | 22 |
| 7.1.2.4. Útero | 23 |
| 7.1.3. Dinámica folicular | 23 |
| 7.1.3.1. Patrones de dos ondas foliculares | 24 |
| 7.1.3.2. Patrones de tres ondas foliculares | 25 |
| 7.2. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES | 26 |
| 7.2.1. Ventajas y desventajas de la transferencia de embriones | 27 |
| 7.3. ULTRASONOGRAFIA BOVINA Y SU APLICACIÓN EN PROGRAMAS DE SOV | 27 |
| 7.3.1. Ecografía de la dinámica ovárica | 28 |
| 7.3.2. Diagnóstico temprano de la gestación | 29 |
| 7.4. SELECCIÓN DE DONANTES | 31 |
| 7.5. SUPEROVULACION | 31 |
| 7.5.1. Control de desarrollo folicular y SOV | 32 |
| 7.5.2. Factores que afectan la respuesta superovulatoria en donantes de embriones | 33 |
| 7.5.2.1. Hormona | 33 |
| 7.5.2.2. Tipos de gonadotrofina utilizada | 34 |
| 7.5.2.3. Vía de administración de las gonadotrofinas | 35 |
| 7.5.2.4. Protocolos hormonales | 35 |
| 7.5.2.5.1. Ablación folicular | 36 |
| 7.5.2.6.2. Tratamiento con progestágenos y estrógenos | 36 |
| 7.5.3. Factores externos | 37 |
| 7.5.3.1. Clima | 37 |
| 7.5.3.2. Nutrición | 38 |
| 7.5.3.3. Efecto de la raza | 39 |
| 7.5.3.4. Edad | 40 |
| 7.5.3.5. Manejo | 40 |

| | |
|--|----|
| 7.5.3.6. Calidad seminal | 41 |
| 7.6. COLECTA DE EMBRIONES | 41 |
| 7.7. EVALUACION DE EMBRIONES | 42 |
| 7.7.1. Estados de desarrollo | 42 |
| 7.7.2. Calidad | 44 |
| 7.8. CRIOPRESERVACION DE LOS EMBRIONES | 45 |
| 7.8.1. Crioprotectores | 46 |
| 7.8.1.1. Permeables o intracelulares | 46 |
| 7.8.1.2. No permeables de bajo PM | 46 |
| 7.8.1.3. No permeables de alto PM | 46 |
| 7.8.2. Conservación de embriones | 46 |
| 7.8.3. Técnicas de criopreservación | 47 |
| 7.8.3.1. Criopreservación en equilibrio | 47 |
| 7.8.3.1.1. Tradicional | 47 |
| 7.8.3.1.2. Transferencia directa | 49 |
| 7.8.3.2. Criopreservación no equilibrada | 50 |
| 7.8.3.2.1. Vitrificación | 50 |
| 7.9. SELECCIÓN DE RECEPTORAS | 50 |
| 7.9.1. Edad | 51 |
| 7.9.2. Examen clínico | 51 |
| 7.9.2.1. diámetro luteal en hembras receptoras | 51 |
| 7.9.3. Nutrición | 51 |
| 7.10. PROTOCOLOS PARA LA SINCRONIZACION DE RECEPTORAS | 52 |
| 7.11. TRANSFERENCIA NO QUIRURGICA DE EMBRIONES BOVINOS | 53 |
| 8.MATERIALES Y METODOS | 54 |
| 8.1. LOCALIZACION | 54 |
| 8.2. GRUPO EXPERIMENTAL | 54 |
| 8.3. CONDICIONES DE MANEJO | 55 |
| 8.4. INFRAESTRUCTURA | 55 |
| 8.4.1. Equipos | 55 |
| 8.5. TRATAMIENTOS APLICADOS PARA EL CONTROL DEL CICLO ESTRAL | 55 |
| 8.5.1. Protocolo convencional de SOV (Control) | 55 |
| 8.5.2. Protocolo SOV convencional modificado (+2 Días P4) | 56 |
| 8.6. COLECTA EMBRIONARIA | 57 |
| 8.7. ANALISIS ESTADISTICO | 57 |
| 9.RESULTADOS Y ANALISIS | 58 |
| 9.1. NUMERO DE EMBRIONES LOGRADOS | 59 |
| 9.2. CALIDAD EMBRIONARIA | 63 |
| 9.3. COSTOS DE LOS PROTOCOLOS SOV | 67 |
| 10. CONCLUSIONES | 73 |
| 11. RECOMENDACIONES | 74 |
| 12. BIBLIOGRAFIA | 75 |

LISTA DE TABLAS

| | | Pag |
|-----------|---|-----|
| Tabla.1. | Hormonas que regulan la reproducción | 21 |
| Tabla.2. | Protocolo de superovulacion con ablación folicular | 36 |
| Tabla.3. | Protocolo de SOV con progestágenos y estrógenos | 37 |
| Tabla.4. | Efecto de la edad sobre el número de embriones producidos | 40 |
| Tabla.5. | Efecto de la calidad seminal sobre la tasa de fertilización y la calidad embrionaria | 41 |
| Tabla.6. | Clasificación de los cuerpos lúteos (CL) según el diámetro luteal | 51 |
| Tabla.7. | Índices de preñez en receptoras de embriones tratadas con CIDR-B y transferidas a tiempo fijo y receptoras sincronizadas con PGF y transferidas a los siete días de observado el celo | 52 |
| Tabla.8. | Protocolo de sincronización hormonal para receptoras en un programa de transferencia de embriones | 53 |
| Tabla.9. | Resultado final de la colecta embrionaria implementando el tratamiento SOV convencional (Control). | 58 |
| Tabla.10. | Resultado final de la colecta embrionaria implementando el tratamiento convencional modificado (+2 Días P4). | 59 |
| Tabla.10. | Prueba t para medias de dos muestras pareadas – número de embriones. | 61 |
| Tabla.11. | Análisis comparativo entre tratamientos implementando la prueba t para medias de dos muestras pareadas para número de embriones | 59 |
| Tabla.12. | análisis de comparativo de resultados finales entre tratamientos (Control vs +2 Días P4) | 60 |
| Tabla.13. | Hembras bovinas que no respondieron al tratamiento SOV control (cero embriones viables) | 61 |
| Tabla.14. | hembras bovinas que no respondieron al tratamiento SOV +2 Días P4 (cero embriones viables) | 61 |
| Tabla.15. | Recopilación de resultados en cuanto a número embriones viables reportados por diferentes autores | 62 |
| Tabla.16. | Prueba t para medias de dos muestras pareadas – calidad embrionaria | 64 |
| Tabla.17. | Número y porcentajes correspondientes clasificados de acuerdo la calidad embrionaria según la I.E.TS entre tratamientos SOV (Control vs +2 Días P4) | 65 |
| Tabla.18. | Costos del protocolo SOV control. | 67 |
| Tabla.19. | costos generales del tratamiento SOV +2 Días P4 | 68 |
| Tabla.20. | Análisis de costos variables del esquema 1 de superovulación, sincronización de la receptora y mano de obra en Colombia | 69 |
| Tabla.21. | Análisis de costos variables del esquema 2 de superovulación, sincronización de la receptora y mano de obra en Colombia. | 71 |
| Tabla.22. | Distribución comparativa entre los costos de los tratamientos SOV | 72 |

LISTA DE ILUSTRACIONES

| | | Pag |
|-----------|---|-----|
| Ilust.1. | Hormonas del ciclo estral | 19 |
| Ilust.2. | Control endocrinológico del ciclo estral | 23 |
| Ilust.3. | Ciclo estral de dos ondas foliculares | 25 |
| Ilust.4. | Ciclo estral de tres ondas foliculares | 26 |
| Ilust.5. | morfología ultrasónica de un ovario superestimulado con FSH | 28 |
| Ilust.6. | Imágenes ecográficas de la dinámica ovárica. cohorte de folículos (1); fase de dominancia en la dinámica ovárica (2); folículo preovulatorio (3) y cuerpo lúteo establecido (4) | 28 |
| Ilust.7. | Diagramas demostrando la manera de anotar los cambios que ocurren en los ovarios durante el ciclo estral. Se encuentran esquematizados los cambios que se podrían observar en vacas con un ciclo estral de 2 ondas (día 0 = ovulación). | 29 |
| Ilust.8. | Diagnóstico de gestación por ecografía. 30 días de preñez (1); 37 días de preñez (2); 48 días de preñez (3) y 55 días de preñez (4) | 30 |
| Ilust.9. | Curva de regresión de la longitud del feto y el día medio de la primera detección de varias características identificadas por ultrasonografía del conceptus durante el período de gestación en 15 vaquillonas (ovulación = día 0) | 30 |
| Ilust.10. | Protocolo de SOV con progestágenos y estrógenos | 37 |
| Ilust.11. | esquema grafico de todos los estadios embrionarios posibles en la clasificación 1-9 marcada por la IETS | 43 |
| Ilust.12. | Punto en dónde se realiza el seeding | 48 |
| Ilust.13. | Tasas de enfriamiento utilizadas en la congelación convencional de embriones bovinos | 48 |
| Ilust.14. | Método para cargar un embrión en una pajueta de “transferencia directa” o “DT” (en una solución de etilenglicol 1,5 M) | 49 |
| Ilust.15. | protocolo de sincronización hormonal en receptoras | 53 |
| Ilust.16. | Protocolo de superovulacion convencional (control) | 56 |
| Ilust.17. | Protocolo de superovulacion +2 Días P4 | 57 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pag |
|---|-----|
| Anexo.1. Hembras blond aquitaine, finca el porvenir, tomada por: Jhonatan castaño. Tomada el 22 de octubre del 2015 | 83 |
| Anexo.2. Laboratorio de clasificación y criopreservación armado, finca el porvenir, tomada por: Jhonatan Castaño. Tomada el 22 de octubre del 2015 | 83 |
| Anexo.3. Implementos en brete para realizar colecta embrionaria, finca el porvenir; tomada por: Jhonatan castaño, tomada el: 22 de octubre del 2015 | 84 |
| Anexo.4. Doctor Mauricio Gonzales realizando el lavado embrionario, finca el porvenir, tomada por: Jhonatan Castaño, tomada el 22 de octubre del 2015 | 84 |
| Anexo.5. Procedimiento de clasificación embrionaria, Jhonatan castaño, tomada por: doctor Mauricio Gonzales, tomada el 22 de octubre del 2015 | 85 |
| Anexo.6. Embriones resultados de una colecta embrionaria. Tomada por Jhonatan castaño, finca el porvenir, tomada el. 22 de octubre del 2015 | 86 |
| Anexo.7. Procedimiento de empacado de embriones en escalerillas, tomada por Jhonatan castaño, finca el porvenir, tomada el 22 de octubre del 2015 | 86 |

1. RESUMEN

La eficiencia en la producción animal depende en gran medida del potencial genético de los individuos que componen el sistema, y de la estrategia que se implemente en la replicación de sus genes, en la ganadería bovina desde hace algún tiempo se vienen usando estrategias de manejo reproductivo basadas en biotecnologías que manipulan el desarrollo de la onda folicular y el momento de la ovulación, siendo la inseminación artificial y la producción de embriones *in vitro* e *in vivo*, las dos más usadas, de la misma forma, ha sido el interés de muchos autores a nivel mundial generar variantes que optimicen los resultados que ofrecen cada una de estas técnicas. El siguiente trabajo tiene por objetivo evaluar la respuesta embrionaria obtenida en un protocolo de superovulación (SOV) convencional implementado en donantes de embriones raza Blonde d'aquitaine ubicadas en la sabana de Bogotá, se propone una modificación que consiste en implantar un dispositivo intravaginal impregnado con progesterona (Sincrogest, 1gr. Ourofino, Brasil.) por dos días adicionales al protocolo SOV (+2 Días P4) con el fin de generar un *priming* de progesterona, manejando la hipótesis que este cambio generaría un efecto positivo en la colecta de embriones, comparando estos resultados con un SOV convencional, el estudio analiza específicamente el número y calidad de embriones colectados, se utiliza progesterona (P4) ya que ejerce un efecto inhibitorio sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios provocando restricción en la secreción de gonadotrofinas, por esta razón el *priming* hormonal se relaciona con la obtención un mayor número de embriones viables y de mejor calidad según reportes literarios. En el presente trabajo al comparar los tratamientos de SOV no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en ninguna de las variables analizadas, pero si hubo diferencias numéricas en cuanto al número y calidad de los embriones colectados, favoreciendo al tratamiento SOV modificado (+2 Días P4). Estos resultados evidencian que el *priming* con P4 logra aumentar la rentabilidad económica de la empresa ganadera, generando un mayor número de embriones viables, lo cual impacta de manera significativa en el progreso genético al lograr producir germoplasma de alta calidad.

Palabras clave: Embriones, superovulación, gonadotrofinas, *priming* y progesterona.

SUMMARY

The animal production efficiency to a large extent depends on the genetic potential of the individuals that make the system, and also on the strategy implemented in their gene replication. In bovine stockbreeding, some biotechnology-based strategies have been used for a while with the result of manipulating the follicular wave development and the ovulation moment, being both artificial insemination and *in vitro* and *in vivo* embryo production the most applied ones, likewise many worldwide authors have been interested in generating some variants in order to optimize the results these techniques offer. The following work's objective is to evaluate the embryonic response obtained from a conventional superovulation protocol (SOV) implemented in embryo donors of *Blonde d' Aquitaine* breed, which are located in the Bogota plateau. The proposal is a

modification that consists in the implementing of an intravaginal device impregnated with progesterone (Sincrogest, 1 gr. Ourofino, Brazil) for two additional days concerning the protocol SOV (+2 days P4), with the purpose of generating a progesterone *priming*, having in mind that this change would generate a positive impact in embryonic collection as a hypothesis, then comparing these results with a conventional SOV. The study specifically analyzes the number and quality of collected embryos. progesterone is used (P4) considering that it exerts an inhibitory effect over the hypothalamic pituitary gonadal axis by causing a restriction of gonadotropins secretion, for this reason, the hormonal *priming* is related to the obtaining of a greater number of better quality and viable embryos according to literary reports. In the actual work, by comparing the SOV treatments, no significant differences were found in any of the analyzed variables ($P > 0.005$), but there were some numerical differences concerning the number and the quality of collected embryos, which suited the modified treatment SOV (+2 days P4). These results make clear that *priming* with P4 manages to increase the profitability in cattle breeding business, by generating a greater number of viable embryos, which has a significant impact on the genetic progress since the production of high quality germplasm is demonstrated.

Keywords: Embryos, superovulation, gonadotropins, priming and progesterone.

2. INTRODUCCIÓN

Colombia es un país en donde el desarrollo de la ganadería busca nuevos horizontes, para ello es de vital importancia reconocer la capacidad ganadera y el contexto que esta misma posee en el desarrollo socioeconómico del sector rural colombiano y de su especialización en los mercados no solo nacionales sino también en la demanda internacional de cortes finos y genética, según estudios realizados por FEDEGAN el sector agropecuario contribuye con un 8,5 % del PIB nacional, la ganadería realiza su aporte con el 1,6 del PIB , dentro del contexto agropecuario la ganadería ocupa un 20% del PIB y un 53% del PIB pecuario (Salamanca. 2012). Su participación a nivel pecuario ocupa poco más de la mitad, es por ello que el rango de producciones a nivel nacional tiene una alta demanda y mediana incursión de biotecnologías, para poder cumplir metas y ampliar la capacidad comercial de la ganadería colombiana, desde hace ya varios años se han venido implementando el uso de biotecnologías enfocadas a mejorar la eficiencia productiva en grandes ganaderías del sector productivo animal colombiano, pese a que estas tecnologías están al alcance de grandes productores aún existen micro-producciones que no están a la vanguardia de las mismas, lo cual atrasa el desarrollo integral de la ganadería en Colombia. El desarrollo productivo de la ganadería está siempre enfrentándose a diversos factores que influyen directamente o indirectamente el progreso continuo de la producción y uno de los pilares para poder tener una producción continua y eficiente es el manejo reproductivo del hato ganadero, para ello con el paso de los años se han realizado avances tecnológicos dando como resultado técnicas reproductivas que facilitan ampliamente el progreso genético del rodeo, poniendo como meta lograr una cría por vaca al año, estas biotecnologías poseen importancia en su desarrollo y permiten ser empleadas,

como herramientas en la aplicación de otras biotecnologías más actuales. (Palma, 2001). El estudio de la reproducción animal ha traído como resultado el avance genético y su difusión a nivel mundial, Todo este proceso de mejoramiento genético se debe a la implementación de biotecnologías reproductivas que han contribuido en el aumento de la productividad y el desarrollo del sector agropecuario; Biotecnologías como la inseminación artificial, la producción y uso de hormonas en animales de interés y el desarrollo de protocolos que permiten la sincronización del desarrollo folicular han facilitado diseñar programas de transferencia de embriones y superovulación. Históricamente se puede mencionar que la técnica de transferencia de embriones comenzó en 1890, cuando Walter Heape, realizó una transferencia de dos embriones de conejos Angora en una hembra receptora Belgian (Biggers,1991). De esta manera comienza la implementación la técnica en diversas especies animales con potencial zootécnico y en la actualidad posibilita la obtención y trasplante de embriones bovinos, suponiendo de esta forma un avance importante en la industria ganadera (Biggers,1991). La transferencia de embriones es una de las biotecnologías reproductivas que han catapultado el mejoramiento genético de razas bovinas, el uso de esta biotecnología como principal método para mejorar la genética de hatos ganaderos y romper las barreras generacionales ha permitido construir empresas ganaderas en un plazo de tiempo más corto, llegando de manera comercial a los productores colombianos ya hace más de 10 años, esta técnica facilita ampliar el potencial genético de la producción y crear bancos de germoplasma permitiendo el transporte de material genético de importancia por medio de la criopreservación a todas partes del mundo, de esta misma forma la importación de material genético variado ayuda a la diversidad comercial nativa, Colazo & Mapletoft (2007), enuncian que al trasplantar embriones importados, se puede observar una mayor adaptación del material genético. En sur america en el año 2013 se colectaron 12545 vacas, de estas colectas se obtuvieron 72770 embriones transferibles de los cuales 32666 se transfirieron en fresco y 34534 se tranfierieron criopreservados (Perry. 2014). La T.E está estrechamente ligada a la inseminación artificial, la Inseminación Artificial (IA) ha sido quizás la biotecnología ganadera utilizada en mayor medida, particularmente en combinación con la criopreservación, permitiendo un mejoramiento genético significativo centrado en la productividad, así como la difusión mundial de germoplasma masculino escogido; estas biotecnologías se complementan con el uso de la sincronización de la ovulación y el sexado de semen, lo cual mejora en gran medida la eficiencia de la IA. (FAO, 2010). Uno de los principales componentes cruciales al momento de iniciar un programa de TE es la superovulación, es importante conocer el protocolo usado que provocará una respuesta incrementada de folículos y dará paso a múltiples ovulaciones, el protocolo convencional utilizado brinda resultados en promedio de 10 estructuras colectadas y entre 5/6 embriones viables, estos resultados varían según reportan diferentes autores, y son muchos los factores que intervienen sobre la respuesta superovulatoria obtenida, dentro de estos factores la nutrición y el intervalo posparto determinan el éxito de un programa de transferencia de embriones (Colazo & Mapletoft, 2007). El objetivo principal de este trabajo consiste en evaluar el efecto de prolongar por dos días más el dispositivo intravaginal de progesterona en un protocolo convencional de superovulación en hembras bovinas, sobre el número y calidad de embriones colectados.

3. HIPOTESIS

La implementación de un dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest, 1gr. Ourofino, Brasil.) durante diez días (protocolo +2 Días P4) en lugar de ocho días (protocolo Control) sobre programas de múltiple ovulación, utilizando un esquema SOV convencional a base de estrógenos y progestágenos busca inducir la sincronización de una nueva onda folicular en hembras bovinas donantes de embriones, la exposición adicional de dos días con el dispositivo provocará un *priming* de P4 el cual tendrá un efecto de retroalimentación negativa sobre las gonadotrofinas hipofisarias evitando la maduración final del folículo en desarrollo previo y permitiendo de esta forma su atresia e inicio de una nueva onda folicular, tomando el dispositivo intravaginal una acción análoga al de un cuerpo lúteo, logrando de esta manera que un mayor número de hembras proporcionen una mejor respuesta superovulatoria representada en número y calidad de los embriones.

El uso de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona proporcionan concentraciones subluteales de esta hormona, imitando fisiológicamente la presencia de un cuerpo lúteo de corta duración (Morales y Cavestany, 2012), lo cual permite una mejor sincronización de las hembras donantes con el uso de estrógenos y progestágenos. Yavas *et al.* (1999) reporta que la implementación del dispositivo de progesterona conlleva luego al desarrollo de un folículo dominante y en consecuencia de este, una mayor producción de estradiol, su ovulación y posterior formación del CL de vida media normal. El crecimiento del folículo dominante y el aumento de la producción de estradiol proveniente de este, es generado por la acción del tratamiento con P4 ya que esta hormona induce una disminución transitoria en la pulsatilidad de LH, al comienzo del tratamiento, seguido por un incremento en la frecuencia de pulsos de LH sobre la producción de estrógenos foliculares, (García, et al.1986), la síntesis de más receptores de LH y la luteinización (Bó, 2002). Autores reportan resultados similares al momento de implementar dispositivos impregnados con P4, concluyendo que este tratamiento mejora los porcentajes de preñez y su desarrollo normal de la misma, en animales sometidos a I.A. (Breuel & Col 1993), (Wiltbank & Col.,2002), el uso de la hormona GnRH en vacas posparto promueve la ovulación, pero los ciclos únicamente serán de duración normal si se utiliza el uso de dispositivos impregnados con P4 de 7 a 12 días antes de la GnRH. (Bó,2002). Al parecer el uso de P4 de liberación lenta es un requisito al querer establecer de nuevo la ciclicidad estral de estos animales posparto. Gastón *et al.* (2007) realizó un estudio en donde evaluó el efecto de un priming de P4 previo a un programa de I.A.T.F, reportando que el grupo tratado con un dispositivo de 0,75 g P4 40 días previos a la I.A.T.F presentó mayor cantidad de vaquillonas con CL ($P=0,003$) en el día 0 (inicio de IATF) con respecto al grupo control resultando intermedio el grupo que se realizó el priming 20 días antes del inicio de la IATF.

4. OBJETIVOS

4.1.OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de prolongar por dos días más (Priming) el dispositivo intravaginal de progesterona en un protocolo convencional de superovulación en hembras bovinas, sobre el número y calidad de embriones colectados.

4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la metodología usada con relación al número de embriones colectados aptos para ser congelados en cada uno de los grupos.
- Analizar la influencia del priming de P4 sobre la calidad embrionaria, teniendo en cuenta la cantidad de embriones grado 1, grado 2, grado 3 y grado 4 (Degenerados e infertilizados), según la conformación de su estructura.
- Establecer los costos que representa la implementación de cada uno de los protocolos de superovulación y su influencia sobre los resultados finales, determinados según el número de embriones viables.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La implementación de protocolos SOV con el objetivo de obtener germoplasma de alta calidad representa un reto que debe ser afrontado teniendo en cuenta que el éxito de esta biotecnología es producto de la eficiencia y buen manejo de diversos factores relaciones directamente e indirectamente con el procedimiento SOV, uno de los principales inconvenientes presentes con los procedimientos SOV es la falta de uniformidad en la respuesta superovulatoria de las hembras donantes de embriones, esta variabilidad en la respuesta, además del “tiempo y el esfuerzo necesario para la administración correcta de los tratamientos, son factores determinantes que afectan directamente la aplicación de este procedimiento en programas de mejoramiento genético” (Bó et al, 2011).

Pese a llevar más de 30 años la implementación comercial de los protocolos SOV y transferencia de embriones a tiempo fijo los resultados son muy variables, las tasas de SOV y de preñez son diversas. Autores reportan que el número de ovulaciones por hembra bovina varía entre 0 y 40 %, además el 30 % de las hembras donantes no proporcionan embriones transferibles o producen muy pocos embriones de baja calidad, y únicamente el 45 % de las hembras donantes produce 4 o más (5) embriones viables. (Galli y Col.,2003), (Jimenez.,2009), (Martínez.,2006).

La calidad de los embriones bovinos juega un papel importante al momento de exportar e importar estas células, su comercio a nivel internacional está basado en la clasificación propuesta por la IETS (international society of embryo transfer) donde solo los embriones de calidad 1 pueden ser comercializados a nivel internacional. La diversidad climática, un balance energético negativo, una inadecuada condición corporal, el tipo de hormona implementada, la raza, la edad y la calidad seminal de las pajueltas implementadas en el programa de SOV, son algunos de los factores que influyen sobre los resultados obtenidos en trabajos SOV y de los cuales se hablará más adelante en este documento.

6. JUSTIFICACIÓN

En un programa de transferencia de embriones, el protocolo hormonal de superovulación y su correcta aplicación es relevante en los resultados finales, pese a que no existe un protocolo SOV definitivo que garantice los mejores resultados y la variabilidad de la respuesta está determinada por la fisiología innata de cada hembra bovina, se pueden implementar estrategias en la aplicación del protocolo de SOV, siendo la utilización de un dispositivo intravaginal impregnado de P4 la estrategia propuesta en este trabajo, este dispositivo intravaginal tiene como fin generar *un priming* de P4, “la exposición previa a esta hormona parece ser necesaria para un desarrollo normal del CL lo cual puede ser consecuencia directa con el incremento de la frecuencia de los pulsos de la hormona hipofisiaria LH sobre la producción de estrógenos foliculares, una síntesis mayor a los receptores de LH y la posterior luteinización (Bó.,2002).”

Por esta razón la modificación del protocolo SOV convencional propuesta en este trabajo consiste en implantar un dispositivo intravaginal dos días de más en las hembras bovinas donantes de embriones, estos dos días de más supone que el dispositivo intravaginal permanezca por 10 días en lugar de 8 días correspondientes al protocolo SOV convencional. En estos dos días adicionales los animales donantes entrarán en contacto con la progesterona proveniente del dispositivo intravaginal, generando un *priming* de P4, esta progesterona actuará como un cuerpo lúteo y generará un feed-back negativo sobre la secreción de las hormonas hipofisiarias, especialmente la hormona LH, evitando la selección de un folículo dominante y facilitando de esta manera la atresia del grupo de folículos presentes y posterior sincronización por medio de estrógenos y progestágenos de una nueva onda folicular. Según Bó (1998), define el *priming* de P4 como la exposición elevada de esta hormona, de carácter exógeno, seguida por su rápida declinación, además considera que este *priming* es un prerequisite indispensable, el cual permita tres acontecimientos: la diferenciación normal de las células de la granulosa, la expresión normal del celo y el desarrollo post ovulatorio del cuerpo lúteo con una fase luteal normal. Este proceso facilita un buen desarrollo folicular, una mejor ovulación a causa del incremento de los niveles de LH y el mantenimiento de un buen cuerpo lúteo que garantiza la permanencia de los embriones para su posterior fecundación y colecta, de esta forma al obtener mayores picos de LH a causa de un efecto de *priming* de P4 influye en el desarrollo final de un folículo dominante preovulatorio.

7. MARCO TEÓRICO

7.1.FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA BOVINA

El éxito de un programa de transferencia de embriones depende del amplio conocimiento sobre la anatomía y la fisiología reproductiva de la hembra bovina, esto con el objetivo de lograr el conocimiento adecuado para poder implementar protocolos hormonales para poder controlar el desarrollo folicular y sincronizar a tiempo fijo estados reproductivos necesarios para implementar las biotecnologías reproductivas. En la producción bovina, el rendimiento reproductivo es importante ya que garantiza una consecuente producción eficiente, y los sistemas productivos están condicionados por factores como las condiciones locales de mercado y el enfoque productivo de cada producción (Ball & Peters, 2004).

7.1.1. Ciclo estral bovino

Cuando la hembra bovina entra en la pubertad ocurren cambios fisiológicos relacionados con el desarrollo reproductivo y hormonal, dichos cambios traerán consigo la presentación de un evento reproductivo conocido como ciclo estral el cual continuará a lo largo de toda la vida de la vaca, exceptuando el periodo de preñez debido al efecto inhibitorio de la P4 y un balance energético desfavorable. Rippe (2009) define el ciclo estral como el tiempo que ocurre entre dos periodos estrales, también llamado celo o calor, y varía normalmente entre 17 a 24 días, considerándose 21 días como el tiempo promedio. Forde et al, (2011) lo define como un patrón cíclico de actividad ovárica que permite a las hembras ir de un periodo reproductivo de no receptividad a uno de receptividad permitiendo establecer el apareamiento y el subsecuente establecimiento de la gestación.

7.1.2. Fases del ciclo estral

El ciclo estral se puede dividir en 4 fases:

- Proestro
- Estro
- Metaestro
- Diestro

7.1.1.1 Proestro

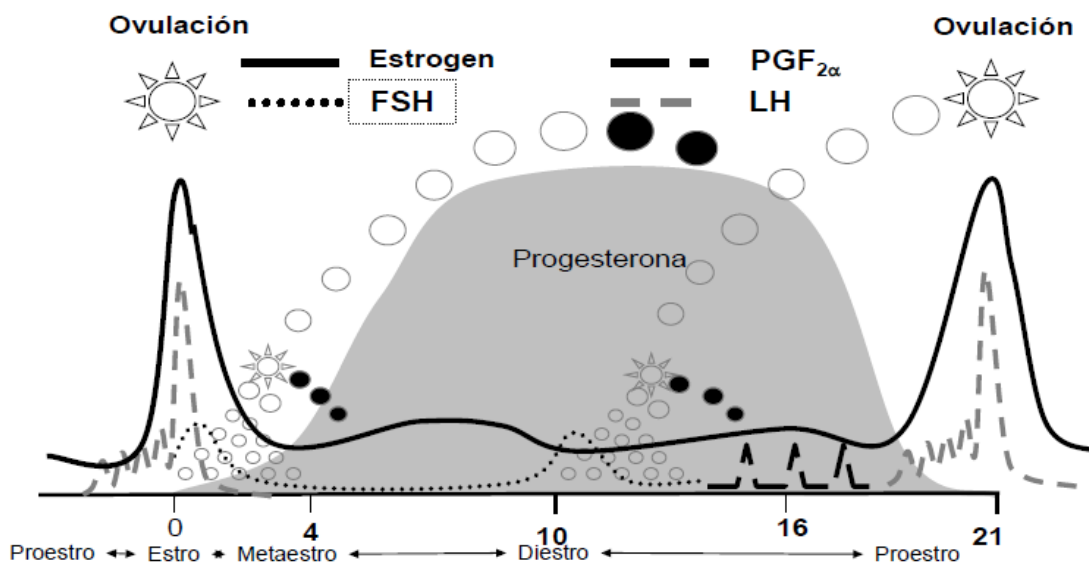
La fase de proestro empieza con la regresión del cuerpo lúteo y termina el inicio del celo, dura alrededor de 3-4 días, durante esta fase la regresión del cuerpo lúteo inicia alrededor del día 18, cuando se presenta el reconocimiento materno de la preñez por parte del útero, al no haber un embrión en desarrollo, se genera una respuesta para la producción de PGF2 alfa para producir la luteolisis del cuerpo productor de progesterona, al eliminar la producción de progesterona se elimina el feed-back negativo que había sobre la secreción de gonadotrofinas, las gonadotrofinas permitirán que continúe el desarrollo folicular y la presencia de un folículo dominante pueda

sucedir, teniendo así que la onda folicular que venía en desarrollo seguirá su crecimiento al no haber la limitación por parte de la progesterona, este desarrollo folicular que ocurre en cada onda de crecimiento se le conoce como dinámica folicular, la dinámica folicular está comprendida en tres etapas que son: reclutamiento, selección, dominancia, sin el efecto de la progesterona, el folículo dominante empezara a producir estrógenos gradualmente, los cuales a su vez iniciarán la bajada de hormonas gonadotróficas para la alimentación de este, una vez alcanzado un mayor tamaño, la cantidad de estrógenos liberados incrementa. Este incremento de estrógenos foliculares es generado por el folículo preovulatorio, los estrógenos llegan a al hipotálamo controlando de esta forma las manifestaciones del celo (secreción de mucosa vaginal, mayor irrigación en la vulva, mayor movimiento) (Rippe.2009).

7.1.1.2. Estro

El estro es una de las etapas de más poca duración del ciclo estral, se considera que su duración es independiente según cada animal y del ciclo productivo en que se encuentre, puede durar desde 30 minutos hasta 30 horas, cabe destacar que vacas en producción presentarían síntomas de celo muchos más cortos. La presencia de celo es provocada por los elevados niveles de estrógenos liberados por el folículo dominante en el ovario, durante este periodo el animal va a presentar receptividad de monta, se habla de un celo plantando cuando la hembra bovina se queda totalmente estática, plantada en sus cuatro extremidades y se deja montar. Se presenta un aumento en las contracciones del tracto reproductivo. Otro factor visual que indica la presencia del estro es la secreción de líquido de consistencia mucosa, este líquido es producido desde el cuello del útero y posee la finalidad de ayudar con el transporte de los espermatozoides a través de esta sección del tracto reproductivo. (Duby,1996).

Ilustración 1. Hormonas del ciclo estral



Adaptado de: Rippe.2009

7.1.1.3. Metaestro

Los estrógenos liberados ejercerán un feed-back positivo sobre la liberación de gonadotrofinas provocando un pico de LH el cual contribuirá a la ruptura del folículo dominante y liberación del ovulo. “De 12 a 24 horas desde el comienzo del celo, el sistema nervioso central del animal se hace refractario a los estrógenos y todas las manifestaciones de celo o calor desaparece” (Rippe. 2009). El periodo de duración que posee el metaestro es de aproximadamente entre 4-5 días, una vez ocurre la ovulación y cae el ovulo hacia el infundíbulo, el folículo empezará a llenarse de sangre y comenzara a formarse una estructura más conocida como cuerpo lúteo, esto es gracias a un conjunto de cambios morfológicos, endocrinológicos y bioquímicos, lo cuales facilitan que las células foliculares se conviertan en células luteales (Palma,2001).

7.1.1.4. Diestro

El diestro posee una duración aproximada de 12-14 días, en esta fase tendremos un cuerpo lúteo productor de progesterona, pero solo hasta el día 8 será totalmente productor de esta hormona por lo cual es refractario a prostaglandinas antes de esto, niveles altos de progesterona se mantendrán hasta el día 18 en donde ocurre un evento conocido como reconocimiento materno de la preñez. López (2008) enuncia que “El reconocimiento materno de la preñez es el proceso fisiológico en el cual el embrión, mediante señale moleculares como la secreción de interferón tau (IFN-t), anuncia su presencia en el tracto reproductivo materno, con el fin de evitar que se desencadene el mecanismo luteolítico ejercido por la prostanglandina F2 α (PGF2 α) sobre el cuerpo lúteo, prolongando la vida de este y garantizando la producción de progesterona para el mantenimiento de la preñez”.

7.1.2. Control endocrinológico del ciclo estral

Rippe (2009), menciona que el ciclo estral, es controlado por un conjunto de órganos: hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero. la acción en conjunto de estos órganos permitirá la producción periódica de óvulos viables, así como de mantener la gestación; todos los cambios ocurridos durante un ciclo estral están determinados por la correlación que poseen los diferentes órganos involucrados y la producción hormonal, se define entonces al eje hipotálamo-hipófisis-gónadas-útero como el responsable del control endocrinológico que ocurre a nivel reproductivo. La interacción entre los órganos responsables de controlar el ciclo estral poseen mensajeros químicos llamados hormonas, los cuales se transportan a través de la sangre y llegan hacia órganos y tejidos específicos, los cuales poseen receptores únicos para dichas hormonas, regulando de esta forma las distintas fases del ciclo estral bovino. (Lamb et al.,2009).

La producción hormonal ejercerá un efecto importante, este efecto puede ser inhibitorio si una hormona provoca la restricción de la producción de otra hormona conociéndose este efecto como retroalimentación negativa o puede ser un efecto estimulante en el cual una hormona promueve la secreción de otra conociéndose como retroalimentación positiva, tendiendo esto en cuenta cabe destacar que una hormona es un mensajero químico, el cual se secreta en un órgano, viaja a través

de sangre y ejerce su función en una célula diana (Lamb et al.,2009). La regulación del ciclo estral y cambios reproductivos son permitidos por la acción de las hormonas que se ven en la tabla 1.

Tabla 1.Hormonas que regulan la reproducción.

| SITIO DE PRODUCCIÓN | HORMONA PRODUCIDA | ACCIÓN |
|----------------------------|--|--|
| Hipotálamo | Hormona liberadora de gonadotrofina GnRH | Libera FSH y LH desde la pituitaria. |
| Pituitaria | Hormona folículo estimulante FS | Estimula el desarrollo del folículo y producción de estrógenos |
| | Hormona luteinizante LH | induce la ovulación, desarrollo del cuerpo lúteo, y producción de progesterona |
| Folículos | Estrógenos | Provoca el comportamiento de estro. Altera la producción de líquidos y la actividad muscular de los oviductos, útero, cuello del útero y la vagina. Causa aumento en la liberación de LH desde la hipófisis durante el estro |
| Cuerpo lúteo | Inhibina | Reprime selectivamente la liberación de FSH |
| | Progesterona | Prepara útero para el embarazo. Evita la repetición de ciclos estrales inhibiendo la liberación de FSH y LH. |
| Útero | Relaxina | Ampliación del útero durante el embarazo y la relajación de cuello uterino en el parto |
| | Prostaglandina | Promociona de regresión Lútea al final del ciclo estral o el embarazo. |
| | Proteínas embrionarias | Proporcionar señal que promueve el mantenimiento de CL durante el embarazo temprano. |

Adaptado de: Dubby, 1996.

7.1.2.1. Hipotálamo

El hipotálamo se ubica en la parte inferior del cerebro conocida como diencéfalo, entre sus neurosecreciones se encuentra la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la cual se sintetiza básicamente en las células que se encuentran en el núcleo arqueado, y de allí se secreta al

sistema portahipofisiario. Según Tovia (2011) la GnRH u hormona liberadora de gonadotropinas es un péptido compuesta por 10 aminoácidos, posee funciones autócrinas y parácrinas, y su vida media es de 2 a 4 minutos, llegando a la conclusión de que el mantenimiento del ciclo estral depende de la continua secreción de esta hormona. La GnRH al ser secretada viaja por medio de los capilares a la hipófisis, más específicamente a la adenohipófisis promoviendo la producción y secreción de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH)

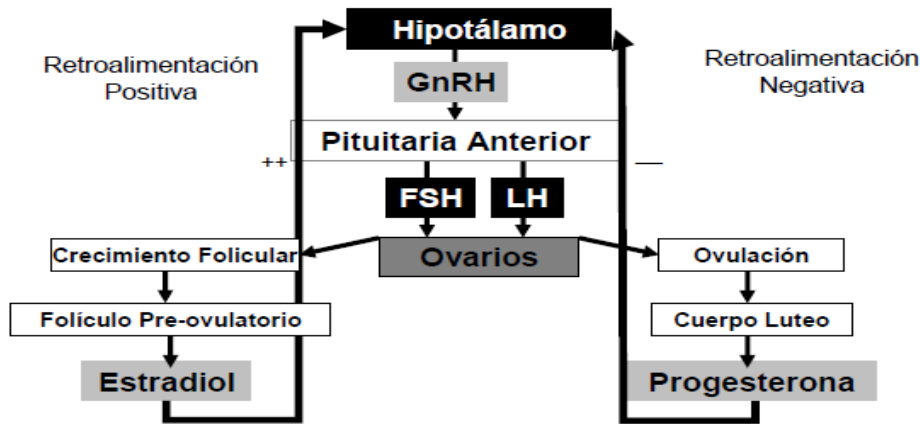
7.1.2.2. Hipófisis

La hipófisis se divide entre la neurohipofisis y la adenohipófisis, la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son secretadas por la adenohipófisis, respectivamente la FSH se encarga del proceso de esteroideogénesis ovárico, crecimiento y maduración folicular, por otra parte, la hormona LH interviene directamente en el proceso de ovulación, formación y mantenimiento del CL (Rippe,2009).

7.1.2.3. Ovarios

Rivera (2009) define a los ovarios como dos estructuras de aproximadamente 1.5 pulgadas de largo y ½ de ancho, la cual posee dos componentes de importancia, el cuerpo lúteo encargado de la producción de progesterona, y los folículos, encargados de la producción de estradiol, a su vez los ovarios se encargan de la producción exocrina de óvulos maduros. Rippe (2009) menciona las dos funciones que cumplen los ovarios a nivel hormonal: la función exocrina encargada de la producción cíclica de óvulos de calidad, y la función endocrina, donde el ovario secreta hormonas: estrógenos o estradiol, inhibina y progesterona. La FSH tiene acción directa sobre los ovarios, esta hormona interviene directamente en la fase de desarrollo folicular promoviendo el crecimiento de un grupo de folículos, de los cuales un folículo se convertirá en dominante, madurará y dará lugar a un ovulo. Antes de que el folículo ovule, alcanza un tamaño mayor al del grupo de folículos reclutados y comienza a secretar paulatinamente estradiol, el estradiol generara un feed back positivo sobre el hipotálamo permitiendo la secreción de hormonas gonadotroficas, a su vez el folículo dominante seguirá alimentándose de la FSH que llega resultado de este feed back positivo, así el folículo dominante comenzara a secretar inhibina la cual afectará a los demás folículos en crecimiento impidiendo la recepción de FSH lo cual provocara que estos folículos no se desarrollen, cuando el folículo dominante alcanza un tamaño específico la producción de estrógenos será mayor produciendo un incremento en la producción de estrógenos, los cuales desencadenaran una bajada mayor de LH para dar paso a la ovulación. Una vez dada la ovulación se dará paso a la formación del cuerpo lúteo, entre los días 4-5 postovulacion se presentará un cuerpo lúteo totalmente formado y a partir del día 8 el cuerpo lúteo será totalmente productor de progesterona. A lo largo del ciclo estral en la vaca, un grupo ovocitos compiten por alcanzar su desarrollo y maduración final (folículos de Graff), dando como resultado un ovulo maduro, en cada onda folicular, un folículo ejerce dominancia, pero únicamente bajo condiciones normales y sin el efecto de retroalimentación negativa de la P4, durante la última onda folicular solo un folículo (dominante) puede dar origen a un ovulo (Rivera,2009).

Ilustración 2. Control endocrinológico del ciclo estral.



Adaptado de: Rippe, 2009.

7.1.2.4. Útero

El reconocimiento materno de la preñez (RPM) se da a partir del día 18 del ciclo estral, el RMP puede definirse como el periodo de tiempo en donde el ovulo fecundado da señales de presencia a la hembra bovina. “Este reconocimiento requiere que el *conceptus* se transforme de esférico hacia una forma elongada para generar una mayor superficie de contacto (precontacto) con el epitelio uterino, con la finalidad de desencadenar la producción del factor antiluteolítico IFN- τ (interferón tau)” (Tovio *et al.* 2008), este interferón tendrá su punto máximo de producción entre los días 14-19 del ciclo estral, su función es ligarse al sitio de contacto en donde las células son más susceptibles a la Oxitocina, en el caso dado de existir la preñez, se comenzara a producir el factor antiluteolítico IFN- τ para garantizar el mantenimiento estructural y funcional del cuerpo lúteo, manteniendo los niveles de progesterona altos y evitando así la producción de prostaglandina. En el caso contrario, si en el reconocimiento materno no se detecta un embrión, la producción de progesterona empezara a disminuir, provocando la activación de los receptores de Oxitocina, la unión de la Oxitocina almacenada en la neurohipofisis con sus receptores y se iniciara la unión del ácido araquidónico. La transformación del ácido araquidónico en PGF 2α , es gracias a la isoforma cox 2 de la prostaglandina sintetasa, gracias a esta enzima es posible la eliminación del CL en caso de no existir una preñez, volviendo a comenzar el ciclo estral. (Roberts *et al.*, 1999).

7.1.3. Dinámica folicular

El estudio y conocimiento de los ciclos reproductivos de la hembra bovina han permitido ejercer biotecnologías para el control de los mismos, permitiendo así incrementar la eficiencia reproductiva de hatos ganaderos. Se conoce entonces al proceso de dinámica folicular como el continuo crecimiento y regresión de folículos antrales de manera cíclica que conlleva al desarrollo de un folículo preovulatorio (Syntex 2005).

proceso que ocurre en el ovario dando como resultado la formación de un folículo dominante preovulatorio el cual dará origen a un ovulo sano. Rajakoski (1960), fue la primera persona en plantear una hipótesis en la cual enuncia que el proceso de crecimiento y regresión folicular esta dado en ondas foliculares a nivel de ovario, esta teoría logró determinar el crecimiento de 2-3 ondas foliculares por ciclo estral en hembras bovinas. La hembra bovina nace con un número determinado de folículos primordiales los cuales a lo largo de su vida se van a desarrollar y a perder en cada una de las ondas foliculares. Durante el desarrollo de cada onda folicular se describen cuatro fases: reclutamiento, selección, dominancia y atresia (Tovio,2012).

La fase de reclutamiento como su nombre lo indica es la fase en donde un grupo de folículos primordiales comenzaran a recibir FSH alimentándose de esta hormona. La FSH tiene un incremento momentáneo previo al reclutamiento folicular (Tovio,2012), comenzando de esta manera una nueva onda folicular, los folículos que son reclutados continúan su desarrollo, en la fase de selección, el desarrollo folicular también está dominada por la hormona FSH y de ella los folículos se alimentaran y seguirán su crecimiento, en la fase de dominancia se va a presentar un folículo de mayor tamaño que los demás, este folículo al ser más grande y presentar mayor superficie, tendrá un número mayor de receptores para FSH y recibirá mayor cantidad de hormona, a su vez producirá inhibina la cual bloquea los receptores de los demás folículos evitando de esta manera que sigan alimentándose y creciendo, el folículo dominante comenzará a producir en pequeñas cantidades estrógenos, los estrógenos comenzaran a ejercer un feed-back positivo sobre el eje hipotálamo- hipófisis-gónadas influenciando así la bajada de hormonas gonadotroficas, el folículo dominante seguirá alimentando se FSH y seguirá produciendo estrógenos, cuando sea suficientemente grande este folículo producirá una gran cantidad de estrógenos los cuales provocaran una mayor la liberación de LH produciendo así el pico preovulatorio en el ciclo estral que dará paso a la ruptura del folículo dominante y liberación del ovulo en las siguientes horas; la hembra bovina al nacer cuenta con una gran cantidad de folículos los cuales se degeneran mediante el proceso conocido como atresia. La fase de atresia folicular se basa en la desaparición de los folículos que no llegan a la dominancia (Tovio,2012). Cuando los folículos sufren atresia, cesa la síntesis de estradiol y las concentraciones de P4 intrafolicular aumentan.

Patrones de ondas foliculares

Autores reportan ciclos estrales que varían en el número de ondas foliculares desarrolladas, dependiendo del número de ondas foliculares (2-3) varia el tiempo de duración del ciclo, describiéndose que en un 95% de los ciclos estrales se presentan dos o tres ondas de desarrollo folicular (Rivadeneira. 2013).

7.1.3.1. Patrón de dos ondas foliculares

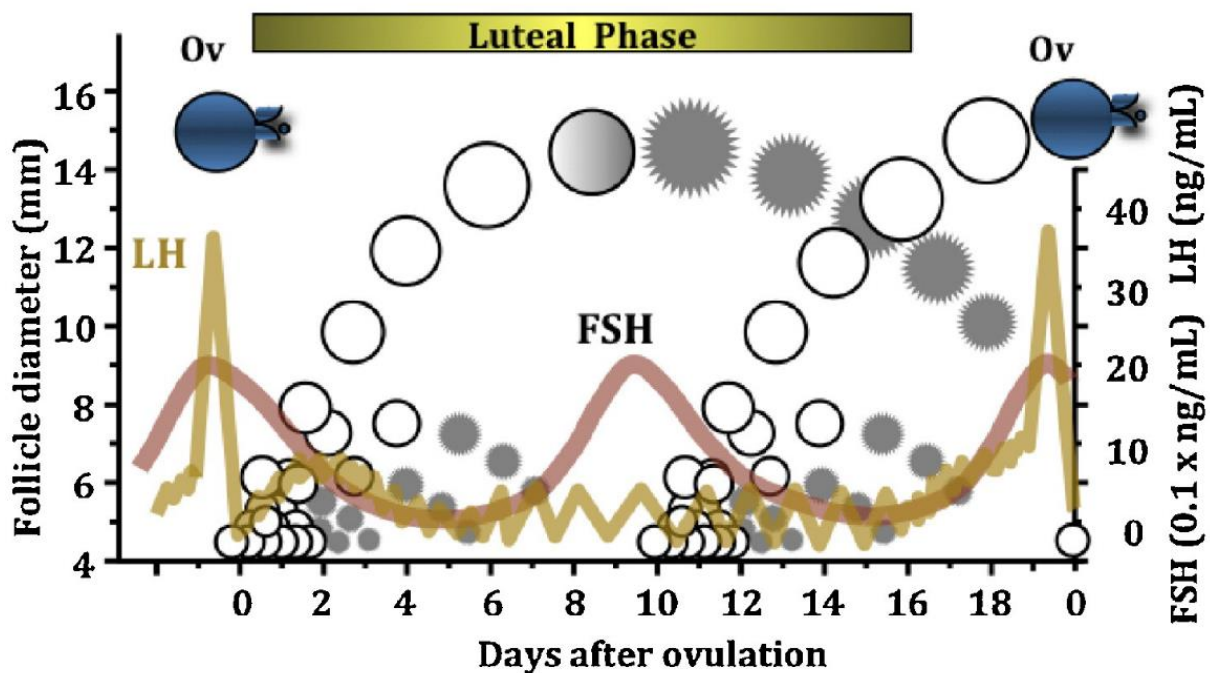
En el patrón de dos ondas foliculares comienza después de la ovulación, y la segunda onda alrededor del décimo día, durante estos días, se describen en el desarrollo folicular de la primera

onda fases de: crecimiento, estática y regresión. (Rivadeneira. 2013). La segunda onda folicular si va a generar un folículo dominante al no haber un feed-back negativo por la progesterona.

7.1.3.2. Patrón de tres ondas foliculares

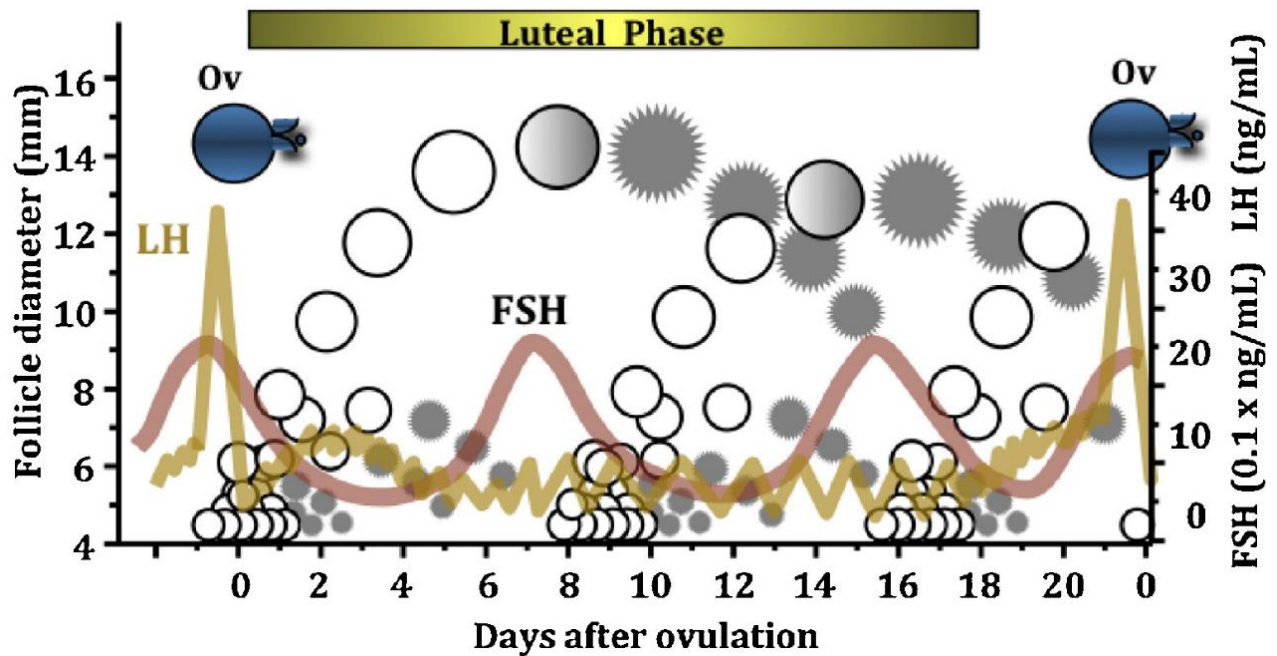
Para el patrón de tres ondas, los inicios de las ondas foliculares comienzan aproximadamente entre los días 0, 8 y 16, las dos primeras ondas no llegan a ovular. No existen diferencias de la primera onda folicular entre los patrones de dos ondas y tres ondas, por otra parte, al ser el patrón de dos ondas foliculares más breve que el de tres ondas, se concluye que la segunda onda empieza de 1-2 días antes que el patrón de tres ondas (Del valle,2008) si el ciclo presenta tres ondas de crecimiento folicular, su emergencia se observa los días 2, 9 y 16 del ciclo.

Ilustración 3. Ciclo estral de dos ondas foliculares.



Adaptado de: Días, 2014.

Ilustración 4. Ciclo estral de tres ondas foliculares.



Adaptado de: Días, 2014.

7.2. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La transferencia de embriones es una biotecnología que consiste en la extracción de múltiples embriones de una hembra bovina donante y en su posterior colocación en el tracto uterino de una hembra receptora. Los costos elevados que implica la realización de programas de Transferencia de embriones a tiempo fijo conllevan a realizar una selección minuciosa de las hembras donantes de embriones, de la precisión, selección adecuada y estricta de estas hembras depende el éxito de esta biotecnología (De la fuente, 2001). La superioridad genética, buenos índices productivos y ausencia enfermedades reproductivas son cualidades importantes al momento de realizar dicha selección, esta hembra donante se verá sometida a un protocolo hormonal con el fin de lograr un control del ciclo estral y causar una superovulación por medio de hormonas exógenas, el objetivo de esta superovulación es lograr el desarrollo sincrónico de varios folículos a nivel de ovario llegando a la dominancia y procediendo a la ovulación teniendo entonces la presencia de varios óvulos viables que serán fecundados mediante la técnica de inseminación artificial, para ello y dependiendo del profesional se pueden realizar desde 2 – 3 inseminaciones en diferentes momentos para lograr una mayor eficiencia de la fertilización de todos los óvulos resultantes, en el día 6 pos inseminación se realiza la colecta de los embriones. Posteriormente a la colecta de embriones se realiza la clasificación embrionaria con el uso de un estereomicroscopio en donde se evalúa su estadio de desarrollo y calidad, una vez realizado esto se procede a empajillar y luego a

realizar la criopreservación. El principal objetivo de la criopreservación es preservar por tiempo indefinido la integridad de la célula germinal en un estado de vida latente artificial mediante la interrupción de su metabolismo (Ochoa,2011).

7.2.1.Ventajas y desventajas de la tranferencia de embriones

La tranferencia de embriones permite la difusion a gran escala de genetica de alta calidad, permitiendo la facil comercializacion a nivel nacional e internacional, permite crear ganaderias en un periodo más corto de tiempo y romper barreras generacionales, establecer nuevas razas en regiones donde no se habian visto, es un negocio rentable ya que permite la venta de genetica y promueve el trabajo; el esclarecimiento de los fenómenos fisiológicos, a la multiplicación y conservación de especies en peligro de extinción, el transporte, conservación e incremento de las producciones animales y como herramienta de primer orden en la conservación de especies en peligro de extinción (De la fuente, 2001).

Como principales desventajas está la variabilidad de la respuesta al momento de realizar la colecta de hembriones, al trabajar con seres vivos, los resultados son muy variables de un animal a otro e influyen muchos factores, los programas de transferencia de embriones utilizando el metodo convencional de superovulacion brinda un resultado jugado a la “suerte” en el cual el sexo de los nonatos sera determinado por ultrasonografía, conociendo entonces que las preferencias por parte de los productores es poseer nuevos animales que sean de sexo femenino ya que estas garanzitan un mayor crecimiento en el hato. Según De la fuente (2001) existe un riesgo asumido durante la realizacion de los protocolos SOV, ya que entre el 20-25% no brinda una respuesta favorable a los tratamientos estimulatorios.

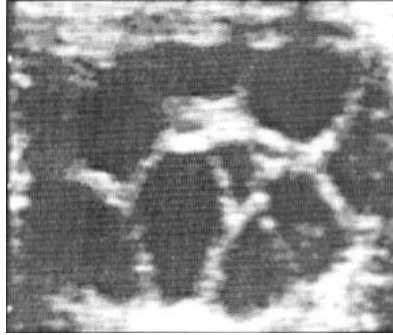
7.3. ULTRASONOGRAFÍA BOVINA Y SU APLICACIÓN EN PROGRAMAS DE SOV Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

La técnica de ecografía utiliza ondas sonoras de alta frecuencia para obtener imágenes de tejidos blandos y órganos internos (Pierson,1988). En los bovinos, la ultrasonografía transrectal y su aporte en la reproducción animal al momento de estudiar en la condición reproductiva de hembras es implementada desde la década de 1980. (Gutiérrez & Baez,2014). Por medio de la implementación de esta técnica ha sido posible el descubrimiento y comprensión de eventos importantes que ocurren durante el ciclo estral (Bó, et al.2000). estos conocimientos han sido aplicados en programas de sincronización hormonal e inseminación artificial, esquemas SOV y transferencia de embriones a tiempo fijo, aspiración folicular y fertilización in vivo e in vitro (Bó et al 2000). Esta técnica permite además una revisión exhaustiva a nivel reproductivo de la hembra bovina, para determinar estados tempranos de preñez, sexaje embrionario y condición fetal. Gracias al uso de la ultrasonografía se logra conocer el momento ideal para el inicio de tratamientos hormonales con el objetivo de lograr un mayor número posible de embriones viables (Bó et al 2000)

7.3.1. Ecografía de la dinámica ovárica

La implementación en el campo de la ecografía ha permitido conocer a profundidad los mecanismos que intervienen en el ovario y su acción durante las fases reproductivas del animal (ondas de crecimiento folicular, dinámica del cuerpo lúteo, ovulación). Los folículos pertenecientes al ovario, son estructuras llenas de líquido, apareciendo en la pantalla del ecógrafo como espacios de color negro (ecogénicas) (Bó et al 2000).

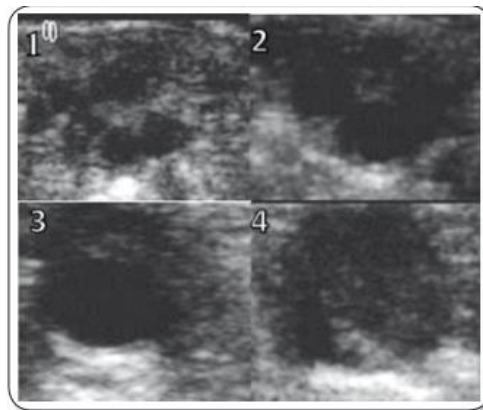
Ilustración 5 Morfología ultrasónica de un ovario superestimulado con FSH



Adaptado de Bó,2000

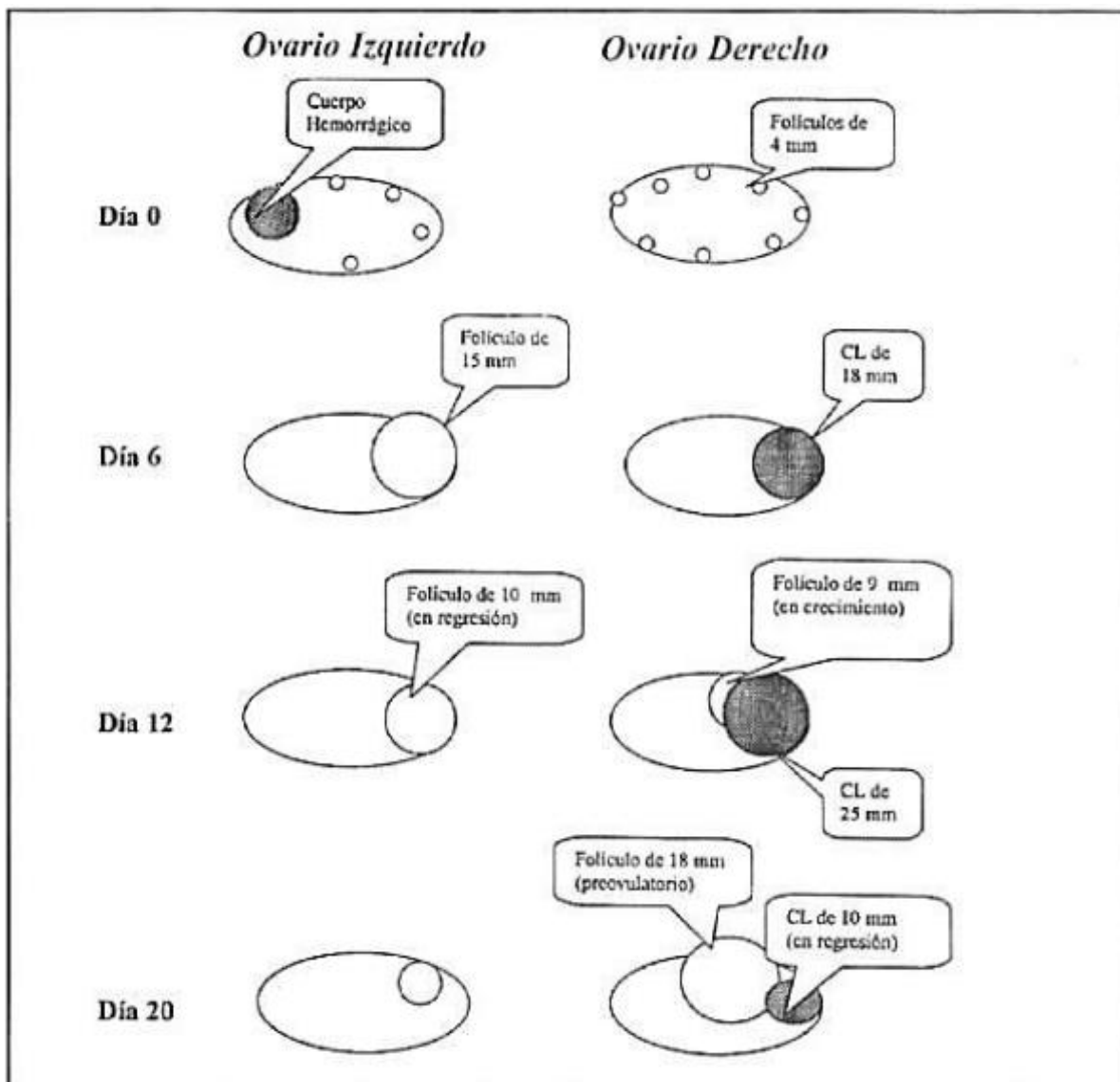
Bó et al. (2000) menciona que los folículos ováricos presentan una forma redondeada, encontrándose también estructuras irregulares, debido en gran parte a la compresión ejercida por los folículos adyacentes al CL, o a la compresión dada entre los mismos folículos y el estroma ovárico. Los folículos pueden ser visualizados, cuantificados y supervisados de forma secuencial a partir de los 2-3 mm (Pierson,1988), o >4 mm (Bó et al 2000).

Ilustración 6 Imágenes ecográficas de la dinámica ovárica. cohorte de folículos (1); fase de dominancia en la dinámica ovárica (2); folículo preovulatorio (3) y cuerpo lúteo establecido (4)



Adaptado de Gutiérrez, 2012.

Ilustración 7. Diagramas demostrando la manera de anotar los cambios que ocurren en los ovarios durante el ciclo estral. Se encuentran esquematizados los cambios que se podrían observar en vacas con un ciclo estral de 2 ondas (día 0 = ovulación).

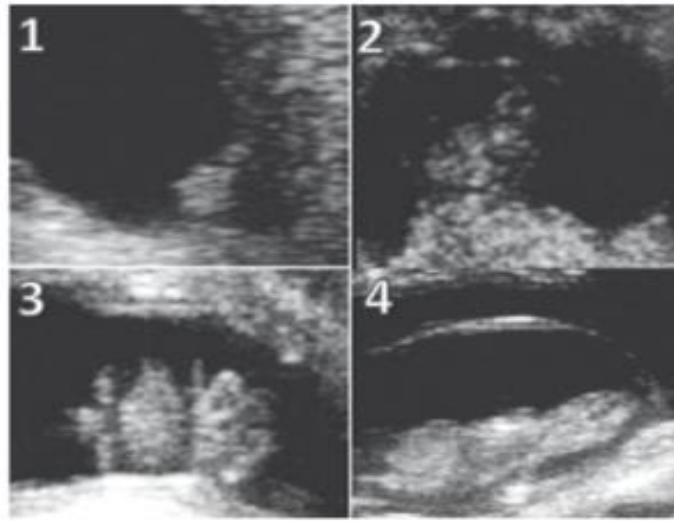


Adaptado de Bó et al.2000

7.3.2. Diagnóstico temprano de la gestación

Mediante el uso del ecógrafo se puede realizar un seguimiento del embrión, analizando su desarrollo con el fin de observar anomalías, muerte o determinar el sexo del feto entre los días 58 y 100 de gestación (Bó et al 2000), un diagnóstico de la preñez antes de estos días puede verse puesta en duda por la presencia de líquido en el útero, ya que puede confundirse con alguna patología (piometria) (Gutiérrez y Baez,2014).

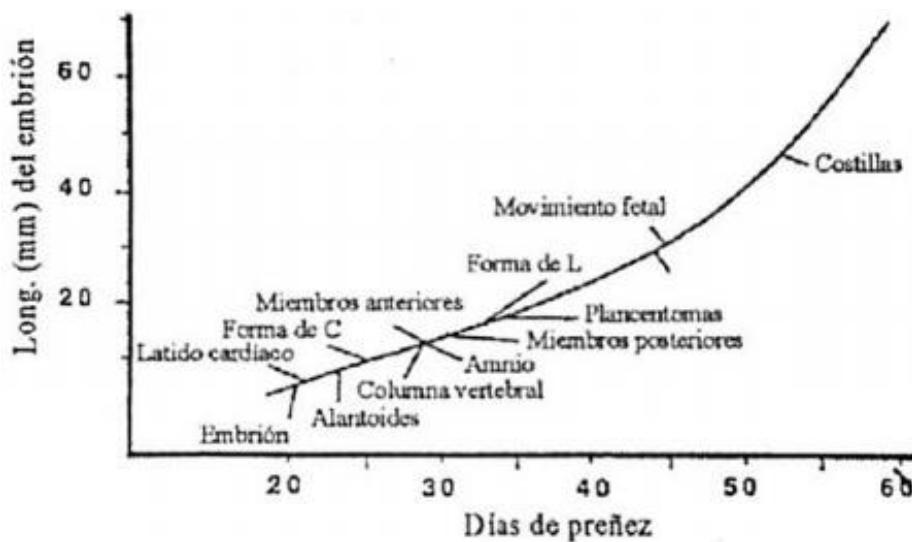
Ilustración 8 Diagnóstico de gestación por ecografía. 30 días de preñez (1); 37 días de preñez (2); 48 días de preñez (3) y 55 días de preñez (4).



Adaptado de Gutiérrez, 2012.

Tendiendo así, que el diagnóstico temprano de la preñez, es muy útil en programas de IA, ya que lo ideal es determinar la presencia de hembras bovinas gestantes (Gutiérrez y Báez 2014). La ilustración 9 muestra el ritmo de crecimiento del embrión junto con el día en que fueron identificadas las diversas estructuras. (Bó et al,2000).

Ilustración 9 Curva de regresión de la longitud del feto y el día medio de la primera detección de varias características identificadas por ultrasonografía del conceptus durante el período de gestación en 15 vaquillonas (ovulación = día 0)



Adaptado de Curran y col, 1986

7.4. SELECCIÓN DE DONANTES

La selección de las hembras donantes es un factor muy importante en un programa de superovulación, la selección depende de factores propios del animal destacando su genotipo, fenotipo y su capacidad productiva. De la fuente (2001), afirma que aún no existe una hembra bovina ideal que complemente todas las exigencias necesarias para un sistema productivo o para adaptarse a una alta demanda momentánea del mercado en cuestión. Dicha selección es realizada por el productor y el profesional encargado de realizar el programa de SOV, se deberá aprobar o no dependiendo del historial clínico del animal y de la condición del tracto reproductivo que posea este por medio de la palpación rectal. “Además de la superioridad genética en las donantes, se deben tener en cuenta factores como ciclos estrales regulares, precocidad reproductiva, el número de servicios por concepción en gestaciones anteriores, comportamiento individual superior a la media del grupo en características de importancia productiva (peso al destete, al año y a los dieciocho meses, etc.)”, (Duica,2010). Así mismo, es necesario determinar qué tipo enfermedades están presentes en la hembra ya que los embriones además de transportar una valiosa información genética, también pueden ser una fuente importante de diseminación de enfermedades reproductivas tales como las producidas por el “herpes virus bovino Tipo 1 (Rinotraqueitis Infecciosa Bovina IBR), el virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), la Leucosis Viral Bovina; agentes bacterianos como *Brucella abortus*, *Campylobacter foetus* Sub. *Venerealis* y *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* y de otras bacterias como *Streptococcus agalactiae*, *Actinomyces pyogenes* y *E. coli*” (Duica, 2010).

Los criterios generales para la selección de donantes según Bó *et al* (2008) son los siguientes:

1. Ciclos estrales regulares y que hayan comenzado a temprana edad
2. Dos o menos servicios por concepción en años anteriores
3. Comportamiento individual superior en características de importancia económica
4. Crías superiores a la media del rodeo, especialmente comparado con sus medio hermanos (hijos del mismo toro)
5. Ningún problema al parto o irregularidades reproductivas
6. Ningún defecto genético o de conformación detectable
7. Entre 3 y 10 años de edad
8. Historia de buena repuesta en superovulación anteriores.

7.5. SUPEROVULACION

Bó *et al* (2008), enuncia que el principal objetivo de los tratamientos de SOV es producir un gran número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez. Sin embargo, la respuesta de los animales es muy variable y depende de diversos factores. La continua necesidad de elaborar protocolos de transferencia de embriones

a tiempo fijo más simples, han conllevado al uso de programas SOV que van desde la implementación de la técnica de ablación folicular, y uso de estrógenos y progestágenos con el fin de sincronizar el control de la emergencia de la onda folicular en hembras donantes de embriones. (BÓ, *et al.* 2011).

Las gonadotropinas ejercen su efecto sobre el ovario interviniendo en el crecimiento folicular, incrementando la multiplicación celular, el crecimiento del ovocito y preparando todo el sistema reproductivo, estas hormonas efectúan su acción en el ovulo produciendo la salida de un mayor número de folículos primordiales del pool folicular y reduciendo considerablemente el número de folículos atresicos. Para alcanzar este fin es necesaria la utilización de hormonas gonadotropas exógenas. La utilización de hormonas para el control del desarrollo folicular bovino varía según la presentación comercial y país, las más utilizadas son; la gonadotropina del suero de yegua gestante (PMSG), la gonadotropina menopáusica humana (HMG) y la hormona folículo estimulante (FSH), de la cual existen numerosos productos en el mercado que proceden de diversos orígenes: Pluset, Folltropin, Ovagen y Stimufol. (De la fuente, 2001).

Según estudios, la respuesta superovulatoria en revisiones de programas experimentales y comerciales de transferencia embrionaria (T.E), evidencian un resultado de 6.2 embriones transferibles colectados por hembra donantes, sin embargo, la variabilidad no es homogénea, el 24% de las colectas no producen embriones viables, 64% de las donadoras producen pocos embriones transferibles y solo el 30% de las colectas o lavados producen 70% de los embriones (Valladares, 2010).

7.5.1. Control del desarrollo folicular y superovulacion

Existen diferentes métodos mediante los cuales se puede controlar la dinámica folicular del bovino, por ejemplo, la ablación folicular es un método mecánico el cual consiste en la eliminación de todos los folículos en desarrollo mediante punción de los mismos utilizando ultrasonografía transvaginal lo que da como resultado en el inicio sincrónico de una onda folicular 1.5 días después. Asimismo, el uso de hormonas para sincronizar el inicio de la onda folicular y la combinación de estas (estrógenos y progestágenos), “Las gonadotropinas actúan sobre el ovario ejerciendo su influencia en el crecimiento folicular, modificando la multiplicación celular, el crecimiento del ovocito y el desarrollo del antrum: de esa forma, aumentan la salida de folículos primordiales del “pool” folicular y se reduce el número de folículos atresicos” (Mariana, 1980).

Como método hormonal los tratamientos con gonadotropinas o GnRH inducen la ovulación del folículo dominante, y el uso consecuente de estrógenos y progestágenos inducen la supresión de los folículos en desarrollo. La superovulación es un área que requiere estricta atención y cuidado. Las investigaciones realizadas en los últimos años no han podido solucionar todavía la variabilidad de la respuesta superovulatoria en la vaca. En un comienzo, los protocolos de SOV iniciaban entre los días 8 y 14 del ciclo estral, esta conclusión llegó según estudios en donde autores reportaban

que en los días 8,9 y 10 del ciclo estral puede iniciar el comienzo de la segunda onda de desarrollo folicular, posibilitando mejorar la sincronización de las hembras bovinas (Valladares. 2010)

Los protocolos de superovulación en su mayoría son comenzados en la fase lútea media, esto es debido a que la fase lútea del ciclo estral bovino es la más larga también conocida como diestro, y en el día nueve aproximadamente comienza la segunda onda folicular, por lo tanto, el tratamiento convencional tiene dos inconvenientes: “1) requiere tener personal entrenado y dedicado a la detección de los celos y una respuesta 100% efectiva a la pre-sincronización de todas las donantes para tener el llamado “celo Base” y 2) desde el punto de vista práctico, es imposible tener a todas las donantes a ser superestimuladas al inicio de una onda folicular el día que elegimos comenzar con la aplicación de la gonadotrofina.” (Bó. *et al.* 2011).

Factores que afectan la respuesta superovulatoria en las donantes de embriones

Existen diversos factores que influyen directa o indirectamente en la respuesta superovulatoria del animal, para lograr excelentes resultados en trabajos de colecta embrionaria es de vital importancia el estudio y análisis de estos factores ya que de ellos dependerá el éxito o fracaso del programa, aun conociendo dichos factores e intentando llevar un control de los mismos la respuesta de las hembras donantes puede llegar a no ser uniforme y esto se debe principalmente a la variabilidad en la fisiología reproductiva de cada vaca, cada animal es un ser vivo distinto por lo cual presenta diferentes resultados al verse sometido a un mismo protocolo es por ello que el éxito de un programa de SOV dependerá de poder analizar bien el conjunto que puedan afectar directamente al animal donante. Estos factores pueden ser divididos entre aquellos relacionados al tratamiento superovulatorio y aquellos relacionados con factores individuales y fisiológicos del animal (Bó.*et al.*,2008).

7.5.2. Factores relacionados al tratamiento superovulatorio

7.5.2.1. Hormona

Un protocolo de superovulación debe ser claro, con el fin de brindar información precisa sobre la aplicación de las hormonas correspondientes para llevar a cabo el desarrollo adecuado del protocolo, se han utilizado tres tipos diferentes de gonadotrofinas para inducir la superovulación en vacas donantes: gonadotrofinas de extractos de pituitaria de animales domésticos, gonadotrofina coriónica equina (eCG) y gonadotrofina menopaúsica humana (hMG) (Bó,2008). Por estas razones la persona encargada de llevar a cabo las aplicaciones hormonales deberá ser muy responsable y consecuente en cuanto a su labor, debe tener capacitación técnica para otorgar un buen manejo de los animales y la aplicación de las inyecciones que deben ser preferiblemente por vía intramuscular, se maneja la aplicación de extractos de pituitaria en 2 inyecciones diarias en las cuales se van a manejar en un rango A:M-P:M, teniendo así que si la primera aplicación es a las seis de la mañana, la segunda será a las seis de la tarde, ya que, la vida media de la FSH es de 5 h y por lo tanto se deben administrar cada 12 h por vía intramuscular (i.m) (Laster,1972).

7.5.2.2. Tipos de gonadotrofinas utilizadas

Existen tres tipos diferentes de gonadotrofinas a nivel comercial que se han utilizado para indicar la superovulación en vacas donantes: gonadotrofinas de extractos de pituitaria de animales domésticos, gonadotrofina coriónica equina (eCG) y gonadotrofina menopáusica humana (Hmg). Los extractos de pituitaria son los más utilizados, dichos extractos poseen cantidades variables de FSH y LH dependiendo del producto y el laboratorio que los manufactura. En su mayoría los tratamientos con gonadotrofinas consisten en dosis decrecientes de FSH durante 4 o 5 días para estimular el desarrollo folicular (Bo et al,2008).

- Folltropin-v (Bioniche Animal Health Canadá inc.). Es un extracto altamente purificado obtenido a partir de glándulas pituitarias de porcinos cuidadosamente seleccionado, tiene una concentración de LH baja en relación a la FSH, Cada frasco de 20 ml contiene FSH equivalente a 400 mg de NIH-FSH-P1. Cuando se reconstituye según las instrucciones de la etiqueta de la solución final contiene 20 mg / ml. (Bioniche animal Health. 2016)
- Pluset (calier, España) Inducción de la superovulación. Aporte adicional de hormona folículo-estimulante (FSH), es un extracto pituitario de porcino, Cada vial de producto liofilizado contiene: Hormona folículo – estimulante (FSH).500U.I. Hormona luteinizante (LH) 500 U.I, viene en proporciones 50 / 50 de gonadotrofinas. (Calier, 2015)
- Ovagen (ICP, Nueva Zelanda) extractor pituitario ovino purificado con poca LH FSH (17.6 mg NIADDK - oFSH-17 /Vial) Agente inductor de superestimulación folicular en animales sometidos a programas de superovulación y transferencia de embriones, Presentación: 1 frasco ampolla conteniendo 17.6 mg NIADDK – FSH - 17 y 1 frasco ampolla conteniendo 20 ml de solvente. (Syntex, 2016)

Gonadotrofina coriónica equina (eCG) es una glicoproteína compleja con actividad FSH y LH. Posee una vida media larga en el sistema circulatorio de la vaca, las dosis de eCG recomendadas oscilan entre 1500 a 3000 UI por animal, usándose generalmente 2500 UI en una inyección intramuscular (Bó.et al.2008), comercialmente se encuentran productos como:

- Novormon 5000 (Syntex, Argentina) Dada su acción dual FSH/LH la eCG o PMSG actúa estimulando en forma directa el desarrollo folicular y la ovulación en la mayoría de las especies domésticas. Los progestágenos (esponjas vaginales, implantes, dispositivos, etc.) utilizados en muchas especies en forma previa, inhiben la liberación de hormonas luteinizante (LH) y folículoestimulante (FSH) de la hipófisis, frenando la ovulación hasta el momento deseado. Cuando los progestágenos son retirados, la concentración de Progesterona en sangre cae rápidamente con lo cual el animal puede entrar en celo. La administración de eCG en ese momento potencia la acción sincronizante de los progestágenos asegurando una perfecta sincronía de celos fértiles (Syntex, 2016)

- Folligon (MSD, ANIMAL HEALTH) Folligon es una gonadotropina sérica de yegua preñada (eCG) con actividad de la hormona folículo estimulante (FSH) en forma de polvo blanco cristalino liofilizado, En hembras aumenta la actividad ovárica, lo que permite mejorar la fertilidad estimular el crecimiento y maduración de los folículos, Cada frasco contiene: eCG 1000 U.I. (MSD, 2016)

El proceso de foliculogenesis es dependiente de hormonas gonadotróficas como la FSH y la LH, pero existe mucha variabilidad entre las concentraciones de estos extractos, un extracto con poca cantidad de LH conllevará a una mejor respuesta superovulatoria. Mediante el uso correcto de gonadotrofinas, los folículos antrales pequeños empiezan a madurar y a desarrollarse, este grupo folicular de aproximadamente 3-6 folículos (2-5 mm) es seleccionado gracias al aumento en la concentración de la hormona FSH. (Palma,2008).

7.5.2.3. Vía de administración de las gonadotrofinas

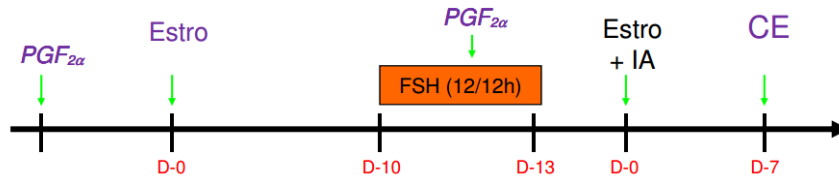
La vía de administración de las gonadotrofinas es muy importante, en los protocolos tradicionales de dos inyecciones diarias de gonadotrofinas (a:m-p:m) se observa que la administración intramuscular proporciona una respuesta superovulatoria significativamente mayor al compararse con inyecciones subcutáneas (Bo.et al. 1991).

7.5.2.4. Protocolos hormonales

En el mercado existen diversos protocolos hormonales enfocados a la superovulación, estos protocolos pueden tener limitaciones según el país de donde se trabaje y según la disposición de productos hormonales. En países como USA, y los conformados por la unión europea, tienen prohibido el uso de estrógenos y progestágenos en programas SOV, lo cual pone en dificultades a los profesionales encargados de realizar estos procedimientos (Lane et al., 2008).

En Colombia el uso comercial de progestágenos y esteres de estradiol es permitido, las combinaciones de estos dos compuestos hormonales permiten la atresia de todos los folículos y por consiguiente el crecimiento de una nueva onda folicular. La ablación folicular como método de sincronización implementado en programas SOV se obtienen ciertas ventajas para los profesionales y productores que no pueden emplear esteres de estradiol y progesterona; la ablación folicular permite iniciar el tratamiento superovulatorio, 24 horas después de realizado el procedimiento, en el periodo de 8 a 12 días post estro, logrando resultados favorables en programas SOV y reduciendo en total los días del tratamiento comparándolo con el tratamiento SOV convencional. (Perez,2011).

Ilustración. Protocolo tradicional de superovulación



Adaptado de: Bó, 2010.

7.5.2.4.1. Ablación folicular

La implementación de la ablación folicular, mediante la ultrasonografía transvaginal es un método eficaz al momento de iniciar un protocolo de sincronización en hembras donantes, esta técnica permite la aspiración de los folículos (>5mm) presentes en el ovario, esto resulta en el incremento significativo de la FSH en sangre y el posterior reclutamiento de una nueva onda folicular 1,5 días después (Bergelt. *Et al.* 1994).

Tabla 2. Protocolo de superovulación con ablación folicular

| TRATAMIENTO | | |
|-------------|---------|---|
| Día 0 | Am | Ablación folicular + inserción de un dispositivo con P4 |
| Día 2 | Am y pm | FSH i.m |
| Día 3 | Am – pm | FSH i.m |
| Día 4 | Am | FSH i.m + PGF i.m |
| | Pm | FSH i.m |
| Día 5 | Am | FSH i.m + retirar dispositivo con P4 |
| | Pm | FSH i.m |
| Día 6 | Am | Celo y/o GnRH |
| | Pm | IA |
| Día 7 | Am | IA |
| Día 13 | Am | Colección de embriones |

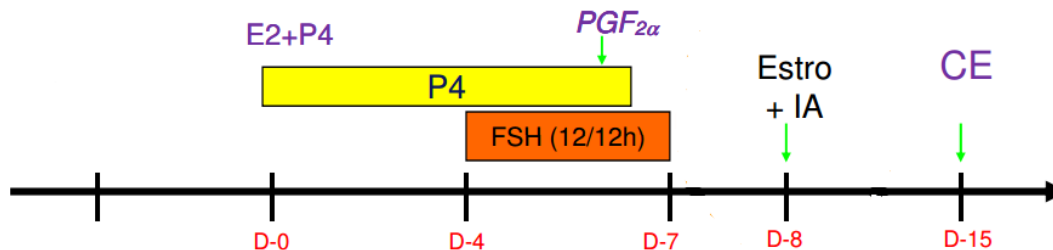
Adaptado de: Bó, 2008.

7.5.2.4.2. Tratamiento con progestágenos y estrógenos

Los progestágenos son compuestos similares a la P4 que están en el mercado desde hace varios años, dentro de estos podemos citar a los de administración oral como el acetato de melengestrol (MGA), los implantes subcutáneos de norgestomet (syncro-mate-B y crestar) y los dispositivos intravaginales con progesterona (PRID, CIDR-B, DIB, Triu-B, Cue-mate, etc.). (Bó.et al. 2008). Los dispositivos intravaginales son sumamente usados a nivel comercial debido a su facilidad de manejo, estos dispositivos deben ser desinfectados antes de ser puestos en el tracto vaginal de la hembra bovina, para ello es recomendable el uso de amonio cuaternario para desinfectar ,en lugar de yodo, ya que el yodo puede irritar la mucosa vaginal, existen productos que van cargados con 0,7 gr – 1 gr de progesterona, estos dispositivos son de liberación lenta y en su primer uso pueden liberar hasta el 60% de progesterona, lo cual nos indica que el 40% restante se libera a partir del

segundo uso, es por ello que se recomienda máximo de un uso en programas SOV. (Davanço,2015).

Ilustración 10. Protocolo de SOV con progestágenos y estrógenos.



Recuperado de: Lozano, 2010.

Tabla 3. Protocolo de SOV con progestágenos y estrógenos.

| DIA | HORA | ACTIVIDAD |
|-----|-----------|---|
| 0 | 8:00 a.m. | Dispositivo intravaginal bovino + P4 inyectable: 2 mg. im. + (estradiol) benzoato de estradiol 2.5 mg. Im |
| 4 | 6:00 a.m. | FSH: 2.0 mg. im. |
| 4 | 6:00 a.m. | FSH: 2.0 mg. im. |
| 5 | 6:00 a.m. | FSH: 1.5 mg. im. |
| 5 | 6:00 a.m. | FSH: 1.5 mg. im. |
| 6 | 6:00 a.m. | FSH: 1.0 mg. im. |
| 6 | | FSH: 1.0 mg. im. + prostanglandina: 2 mg. i.m. |
| 7 | 6:00 a.m. | FSH: 0,5 mg. im. + prostanglandina: 2 mg. i.m. retiro dispositivo P4 |
| 7 | 6:00 a.m. | FSH: 0.5 mg. im. |
| 8 | 6:00 a.m. | GnRh: 2,5 mg.i.m. + IATF |
| 8 | 6:00 a.m. | IATF |
| 9 | 6:00 a.m. | IATF |
| 15 | 6:00 a.m. | Colecta, transferencia y congelación de embriones |
| 24 | 8:00 a.m. | Prostanglandina. 2 mg.im. |

Progesterona:(Sincrogest 1 gr, gestavec); estradiol: (benzoato de estradiol); FSH: (folltropin); prostanglandina: (sincrocio); GnRh:(sincroforte).

7.5.3. Factores externos

7.5.3.1. Clima

Dentro de los factores externos que intervienen dentro del programa para la obtención de embriones el clima toma un rol muy importante; el animal donante primero debe adaptarse a las condiciones climáticas y a los cambios bruscos de temperatura que se puedan presentar, Colombia

al ser un país ecuatorial presenta un clima muy homogéneo a lo largo del año, pudiendo variar según se presenten los fenómenos atmosféricos como lo son el fenómeno del niño o de la niña, acompañados de altas temperaturas, escases de agua y escases o disponibilidad de alimento según se presenten tiempos de sequía o de lluvias, estos factores determinan la capacidad reproductiva que una hembra donante pueda tener. Veles et al. (2010) menciona que la activación del eje hipotálamo-hipofisiadrenal ante situaciones de alerta (estrés) libera mecanismos que estimulan la adaptabilidad del organismo, aumentando así las oportunidades de supervivencia. Sin embargo, dicha activación y sus hormonas en lo individual afectan el funcionamiento reproductivo de varias especies animales en diversos niveles: secreción de GnRH hipotalámica, secreción de gonadotropinas desde la hipófisis, funcionamiento gonadal y falla en la expresión conductual del estro (Alvarez,2008).

El clima además es uno de los principales actores más influyentes en el desarrollo y recuperación adecuada de pasturas, el clima determina la cantidad de alimento disponible dirigido para la nutrición adecuada de las hembras donantes, el forraje al ser la fuente de alimento más económico para la producción no supe todas las necesidades de las hembras donantes (Peri.2015).

“Ante este marco, los Sistemas Agroforestales y los Silvopastoriles tienen un rol importante en Latinoamérica, como herramientas para satisfacer la provisión de bienes, la generación de empleo y de servicios ambientales. establecer sistemas silvopastoriles con leguminosas y especies arbóreas para ramoneo es una estrategia ideal que contribuye a la nutrición de las hembras y ofrece alternativas para el mantenimiento en épocas difíciles. En las últimas dos décadas la comunidad científica, algunas empresas innovadoras y numerosas familias campesinas latinoamericanas demostraron que los sistemas agroforestales y silvopastoriles son apropiados para intensificar áreas de pastoreo y además desempeñar un rol estratégico en la provisión de alimentos de buena calidad y bienes forestales” (Peri.2015).

7.5.3.2. Nutrición

La nutrición juega un papel importante sobre la reproducción. Belén (2011), menciona que el estado nutricional en el que se encuentren los animales a momento de iniciarlos en un tratamiento superovulatorio es clave, ya que de ello dependerá la respuesta embrionaria, se aconseja el manejo adecuado de las raciones nutricionales con el fin de brindar altos niveles energéticos a la hembra bovina. Por esta razón debe existir un balance energético ideal para que los animales no caigan en déficit o en excesos. Al existir un balance energético negativo, el estado endocrino y la funcionalidad ovárica será vista afectada, demostrando resultados deficientes al final del protocolo SOV, evidenciados en óvulos menos fértiles. La importancia de los macrominerales es importante también, las funciones reproductivas se ven controladas por macrominerales como: el calcio, fósforo, azufre, magnesio, potasio, sodio y cloro, es por ello que su inclusión adecuado en un balance nutricional eficiente permite el desarrollo normal de donantes y receptoras en programas de transferencia de embriones (Gorosito,2007).

Una vaca con condición corporal pobre presentará problemas reproductivos al momento de sintetizar hormonas esteroideas esto se debe a que el precursor de dichas hormonas como los estrógenos y progesterona es el colesterol, por el contrario, si la condición corporal es muy alta se presenta otro problema; Orellana & Peralta (2007) mencionan que las hembras bovinas al poseer una condición corporal elevada, acumulan demasiada grasa a nivel subcutáneo y alrededor de los ovarios, esto, afecta la eficiencia de las drogas implementadas. Es recomendable trabajar a vacas en condición corporal de 2.5-3 en una escala de 1 – 5, la nutrición debe ser la principal herramienta a trabajar para obtener una buena respuesta superovulatoria de los animales, una buena suplementación energética y mineral garantizara un mejor rendimiento reproductivo. “Un balance energético negativo en vacas se traduce en un retraso en la ovulación postparto, por falta de metabolitos para secreción hormonal, afectando la rentabilidad de las producciones lecheras” (Moyano & Rodriguez.2014), el colesterol es el principal componente precursor de hormonas esteroideas, hormonas como la progesterona y estrógenos; Bajo la influencia de la progesterona, el útero produce una sustancia nutritiva para el embrión llamada leche uterina. A la vez, la P4 fomenta la formación del tapón mucoso en el cérvix, este tiene la función de evitar el ingreso de microorganismos al útero (Dejarnette & Nebel. 2006), la P4 suprimen la secreción de la hormona LH, este efecto resulta en la inhibición de la maduración final del folículo y la ovulación, esta supresión es efectuada por el feed-back negativo que ejerce la progesterona sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, la otra hormona esteroidea que necesita colesterol para su adecuada síntesis es el estrógeno, “los estrógenos, provocan las manifestaciones de la conducta del estro o celo, determinan mayor vascularidad de los conductos genitales, produce la secreción de las glándulas mucosas del cérvix y de la parte anterior de la vagina y provocan el crecimiento del sistema de conductos de la glándula mamaria. La femineidad o caracteres sexuales secundarios de la vaca se deben principalmente a la acción de los estrógenos” (Rafaelli. 2013)

7.5.3.3. Efecto de la raza

La gran variabilidad individual de hembras bovinas en programas SOV es evidente y representa un factor no controlable (Bó.et al.2008), es por ello que se deben manejar todas las variables posibles para así poder obtener una mejor respuesta superovulatoria y mayores resultados, en este sentido Chupin.et al. (1985) sugiere según su estudio, animales de la raza Holstein necesitan una cantidad mayor de FSH, mientras que animales de la raza charoláis, requieren una proporción mayor de LH para obtener una máxima respuesta superovulatoria. Es por ello que se deben ajustar los protocolos dependiendo de cada situación, teniendo en cuenta factores de manejo, temperatura, edad entre otros, estos requerimientos específicos para cada sistema productivo pueden provocar una impresión de dificultad al momento de superovular hembras bovinas (Jimenez.2009).

Analizando comparativamente a los animales Bos Taurus y Bos Indicus, existen diferencias a nivel reproductivo desde su pubertad, teniendo así que los animales Bos Taurus son más precoces reproductivamente, entrando a la pubertad entre los 14-19, meses, mientras que los animales Bos Indicus llegan a la pubertad a partir de los 19-20 meses. Dentro de los factores que influencia la

presentación del primer estro están: el ambiente, la raza, el fotoperiodo y estado nutricional (Cunningham, 1997).

Según reporta Aké et al. (1995) comparando animales Bos Taurus y Bos Indicus sobre la respuesta SOV, encuentra que las donantes Bos Indicus tuvieron mayor promedio de cuerpos lúteos (15.1 +- 7.4 vs 10.8 +- 4.9, respectivamente; $P > 0,005$) y mayor promedio de embriones recuperados que las donadoras Bos Taurus (11.6 +- 7.9 vs 6.6 +- 4.1, respectivamente, $p > 0.005$). En cuanto al promedio de embriones transferibles por donadora, también se observó una ligera superioridad de los animales Bos Indicus con respecto a los Bos Taurus (7.8 +- 4.2 vs 6.6 +- 4.1, respectivamente; $p > 0.05$).

7.5.3.4. Edad

La edad juega un papel clave, como se mencionaba anteriormente los animales Bos Taurus son más precoces reproductivamente, llegando más rápido a la pubertad, gracias a esto los Bos Taurus comenzarán a ovular más pronto y podrán entrar a programas de SOV a una edad más temprana en comparación con los Bos Indicus. Los animales jóvenes son más susceptibles al efecto provocado por hormonas exógenas, sobre todo a la FSH (Hasler et al. 1983). Este mismo autor reporta en un estudio donde analiza las tasas de preñez, concluyendo que los animales mayores a 15 años presentan tasas de preñez más bajas.

Tabla 4. Efecto de la edad sobre el número de embriones producidos

| Edad | N | Estructuras/ Donante | Embriones/ Donante | Fertilización (%) | Recuperación (%) |
|--------------------------|-----|-------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| Novillas | 28 | 6,1 | 3,8 | 69 | 57 |
| Novillas primer parto | 26 | 8,0 | 5,3 | 67 | 80 |
| 3-6 años | 282 | 10,6 | 6,8 | 67 | 90 |
| 7-10 años | 224 | 10,6 | 6,9 | 67 | 83 |
| 11-14 años | 64 | 9,7 | 5,3 | 57 | 83 |
| >14 años | 9 | 5,6 | 2,6 | 50 | 97 |

adaptado de Hasler et ál.1983

7.5.3.5. Manejo

Aspectos básicos como un buen manejo garantizan una calidad productiva y reproductiva de las hembras donantes, un mal manejo podría traer consecuencia negativa en los animales, no manejar adecuadamente protocolos para el ordeño, no aplicar las buenas practicas ganaderas y el uso constante de tábano u otras medidas que generan estrés en los animales se verán representado en un futuro como bajas productivas y reproductivas en el animal objetivo. en un estudio realizado por Lozano et al. (2010) se evaluó el efecto que tenía el estrés calórico sobre la producción de embriones en vaca superovuladas, para ello vacas lactantes de la raza Holstein fueron superovuladas en la época templada (n=20) y cálida (n=22). Los embriones fueron colectados,

congelados y transferidos a vacas Holstein lactantes durante la época templada (n=54) y cálida (n=53). En los resultados, la respuesta superovulatoria (85.1%) y la tasa de fertilización (76.2%) fueron similares en ambas épocas ($P>0.05$). En la época templada, el número de óvulos y embriones (10.6), y embriones transferibles (7.4) colectados por vaca fueron superiores a los observados en la época cálida (6.1 y 4.4, respectivamente) ($P<0.05$).

7.5.3.6. Calidad seminal

La calidad seminal intervine directamente sobre la fertilidad embrionaria, escoger buenas pajillas que posean una buena cantidad y calidad seminal postdescongelación permitirá incrementar los porcentajes de preñez. Chenowet (2007) hace referencia en su estudio sobre la calidad seminal sobre la tasa de fertilización y calidad embrionaria obtenida.

Tabla 5.Efecto de la calidad seminal sobre la tasa de fertilización y la calidad embrionaria.

| Calidad seminal | Fertilización (%) | Embriones excelentes (%) |
|-----------------|-------------------|--------------------------|
| Excelente | 82,1 A | 61, 2 ^a |
| Bueno | 67,6 b | 55,7 b |
| Regular | 58,3 c | 53,9 c |
| Malo | 51,3 d | 33,7 d |

Adaptado de chenowet, (2007)

7.6. RECUPERACION DE EMBRIONES (CIRCUITO CERRADO)

Para realizar el lavado o colecta de embriones, se utilizan sueros enriquecidos con proteínas y nutrientes junto con medios de colecta, los cuales deben dar un confort al embrión que es colectado. En este modelo, se implementa entre 1-1.5 lts de medio de lavado uterino el cual se une a la sonda Foley de dos vías mediante un sistema de conducción con válvulas de ingreso y de salida, el cual permite su llegada al cuerno uterino para proceder a la colecta, una vez que no entra más medio de lavado al cuerno uterino se cierra el tubo de entrada y se masajea de manera que el medio lave todo el cuerno. Luego se abre el tubo de salida y se colecta el medio por gravedad (Bó et al.2008), llegando de esta forma al filtro de colecta embrionaria.

Una vez terminado el procedimiento en un cuerno, se desinfla el balón de la sonda Foley, ubicando la sonda en el otro cuerno, volviéndose a inflar el balón para facilitar la permanencia del sistema en el cuello uterino mientras se realiza el procedimiento. “debe tenerse mucho cuidado en que la punta del estilete no pase a través de uno de los orificios de la sonda Foley ya que esto producirá, sin duda, una ruptura del cuerno “(Bó et al.2008)

7.7. EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES

Después de recuperado el medio de lavado uterino (solución PBS) los embriones deben ser aislados del volumen total utilizando diversos métodos de filtración y drenaje, de esta forma comienza la clasificación morfológica y calidad según la IETS. (De la fuente,2001). La evaluación embrionaria permite obtener índices de calidad y su comercialización a nivel internacional es supervisada por la IETS, la seguridad sanitaria que ofrecen los embriones facilita su importación y exportación permitiendo el uso de diferentes razas de animales y su genética, debido al bajo riesgo de transmisión de enfermedades. “Dado el reducido tamaño del embrión y su movilidad limitada se reducen las posibilidades de exposición a los agentes patógenos, no existiendo al inicio, entre 6 y 9 días de gestación ningún intercambio directo ni gaseoso ni metabólico entre el embrión y el ambiente uterino, Por último, la zona pelúcida, cuando está intacta, al ser una membrana no celular actúa a manera de barrera física para bacterias y virus que no podrán penetrarla, aunque podrían acompañarle en la recogida y posterior transferencia” (De la fuente,2001). Los embriones se suelen clasificar en base a un sistema de código de número para su etapa de desarrollo (de 1 a 9) y por su calidad (1 a 4). Los principios básicos de la evaluación de embriones se describen brevemente. (Bó & Mapletoft.2013)

La Evaluación de embriones bovinos se hace normalmente con un estereomicroscopio a 50 a 100X de aumento, con el embrión en un pequeño plato de sujeción. Es necesario buscar en todo el plato de sujeción con el fin de ver el embrión y zona pelúcida desde diferentes perspectivas. El diámetro total del embrión bovino es de 150 a 190 micras, incluyendo un espesor de la zona pelúcida, de 12 a 15 micras. El diámetro total del embrión se mantiene prácticamente sin cambios desde la etapa de células hasta el estadio de blastocisto. Un embrión ideal es compacto y esférico (Bó & Mapletoft.2013)

La clasificación embrionaria sigue las normas de la IETS (Sociedad internacional de transferencia de embriones) y permite altos estándares de calidad mediante la clasificación de los embriones bajo su calificación según los estados de desarrollo y calidad embrionaria (Bó & Rodriguez. 2006)

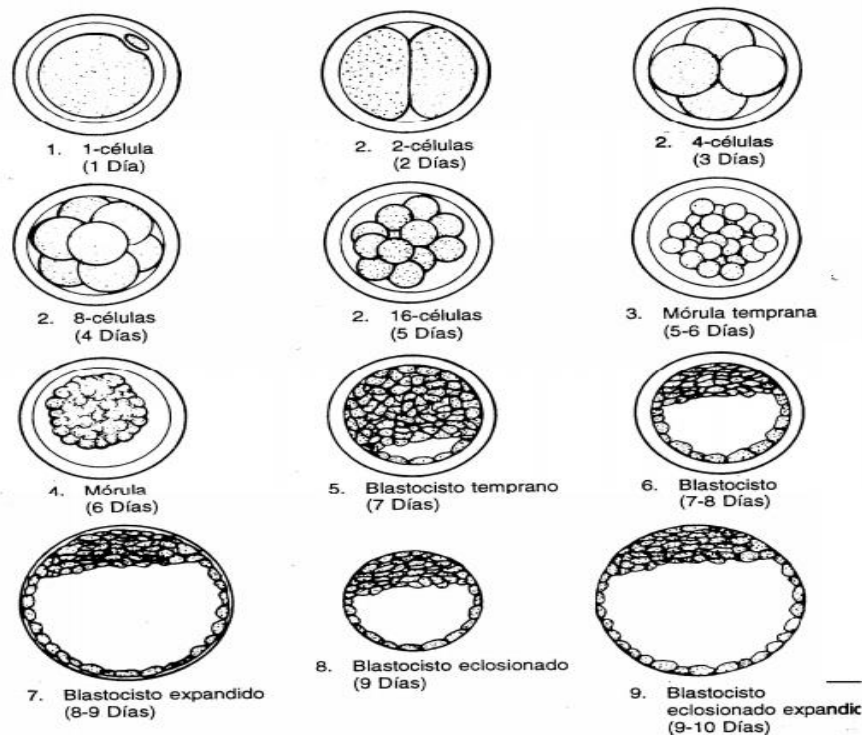
7.7.1. Estados de desarrollo

Los primeros estadios se denominan según el número de células presentes: 2 células, 6 células, 8 células, hasta 16 células, a partir de este punto Bó.et al. (2008) propone la clasificación embrionaria de la siguiente forma:

- “Mórula (estadio 4): se asemeja a una mora. Las blastomeras son difíciles de distinguir unas de otras. La masa de células (embrión) ocupa casi todo el espacio perivitelino (edad estimada de 5 días)
- Mórula compacta: las blastomeras se han juntado formando una masa compacta. El embrión ocupa el 60-70% del espacio perivitelino.

- Blastocisto temprano (estadio 5): presenta una cavidad con fluido o blastocele, dando la apariencia de un sello como anillo. El embrión ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Se puede en este estado diferenciar en forma visual el trofoblasto y el macizo celular interno (edad estimada 7 días).
- Blastocisto (estadio 6): presenta una diferencia clara entre el trofoblasto externo y el macizo celular interno (más oscuro), el blastocisto es identificado con claridad y el embrión ocupa casi todo el espacio perivitelino (edad estimada 7-8 días).
- Blastocisto expandido (estadio 7): el diámetro aumenta 1.2 a 1.5 veces. La zona pelúcida se adelgaza aproximadamente 1/3 del grosor original. Los embriones en este estado se pueden encontrar colapsados (edad estimada 8-9 días)
- Blastocisto eclosionado: en este estado los embriones pueden estar en el proceso o estar completamente fuera de la zona pelúcida. Los blastocitos eclosionados son esféricos con el blastocele bien formado o colapsado. Es muy dificultoso en este estado la identificación del embrión por un operado inexperto (9-10 días.)”

Ilustración 11. esquema grafico de todos los estadios embrionarios posibles en la clasificación 1-9 marcada por la IETS.



Adaptado de: Bó. et al. (2008)

El código para el grado de desarrollo es numérico. El número 1 identifica un oocito sin fertilizar o un embrión de una célula. El número 2 identifica embriones con dos a 16 células (aproximadamente día 2 a día 5). El número 3 identifica una mórula temprana, y los números 4 a

9 identifican a los embriones en estadios posteriores a la compactación, como se ilustra arriba. En una transferencia comercial, generalmente los embriones son colectados a los 6 a 8 días del ciclo estral (de mórula a blastocisto).

7.7.2. Calidad

Bó et al. (2008) menciona las principales características analizadas al momento de calificar los embriones.

- Forma del embrión
- Color y textura de la masa celular
- Número y compactado de las blastomeras
- Diferencia de tamaño entre blastomeras
- Tamaño del espacio perivitelino
- Presencia de blastomeras sueltas, degeneradas o detritus celulares
- Presencia, número y tamaño de vesículas (indican degeneración)
- Apariencia de zona pelúcida.

De acuerdo a las pautas anteriores Bó & Mapletoft (2013), clasifican los embriones de la siguiente manera:

- “Código 1: excelente o buena. Los embriones tienen una masa simétrica y esférica con blastómeros individuales que son uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es consistente con su etapa de desarrollo esperado. Las Irregularidades deben ser relativamente menor, y al menos 85% del material celular deben ser una masa embrionaria intacta, viable. Este juicio debe basarse en el porcentaje de células embrionarias representados por el material extruido en el espacio perivitelino. (Bó & Mapletoft.2013)
- Código 2: aceptable. Estos embriones tienen irregularidades moderadas en la forma general de la masa embrionaria o en tamaño, color, y la densidad de las células individuales. Al menos 50% de la masa embrionaria debe estar intacto. La supervivencia de estos embriones en el procedimiento de congelación / descongelación es menor que con los embriones Grado 1, pero las tasas de embarazo son adecuadas si los embriones se transfieren como fresco en receptores adecuados. Por lo tanto, estos embriones son a menudo llamados "transferibles", pero no "congelables".
- Código 3: Pobre. Estos embriones tienen importantes irregularidades en la forma de la masa embrionaria o en tamaño, color, y la densidad de las células individuales. Al menos 25% de la masa embrión debe estar intacto. Estos embriones no sobreviven el /

procedimiento de congelación y descongelación tasas de embarazo son inferiores a los obtenidos con embriones justas calidad si transfiere fresco a los destinatarios adecuados.

- Código 4: muerto o degenerando. Estos podrían ser embriones, óvulos o embriones de células 1. Ellos no son viables y deben desecharse.”

7.8. CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES

La criopreservación es una excelente herramienta en programas de transferencia de embriones, este procedimiento permite conservar material genético de muy buena calidad por un tiempo indefinido de tiempo, conservando genética y permitiendo su difusión, representa además ventajas económicas, de manejo y sanitarias eliminando el problema de las enfermedades. Sustituyendo la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de enfermedades de importancia sanitaria (Palma.2001), lo cual representa una gran ventaja, la exportación e importación de embriones es por mucho un acontecimiento que diversifica la genética mundial de ganado bovino facilitando el desarrollo de ganaderías las cuales representan el futuro alimenticio de mercados especializados. Una ventaja importante de la criopreservación supone la transferencia de embriones en épocas determinadas para programar el nacimiento ideal según la época del año (Bó et al.2008), otra ventaja de este procedimiento es la facilidad de transporte, ya que los embriones pueden ser colectados en un lugar, criopreservados y luego comercializados a cualquier parte del mundo (Bó et al.2013)

(Belascoain.*et al.*2010). define la criopreservación como el proceso mediante el cual las células germinales son congeladas a temperaturas bajas (-196 °C), con el fin de disminuir las funciones vitales de la célula, y mantenerlo en un estado de vida suspendida por tiempo indefinido. “A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas.” (Ochoa. 2011.p12.)

Dentro de los objetivos de la criopreservación, Ochoa (2001) define que el objetivo de la interrupción del metabolismo por un tiempo determinado arbitrariamente durante el que los embriones se encuentran en una anabiosis (estado de vida latente) artificial. Por otra parte, Medeiros. et al. (2002), cree que el objetivo principal de esta técnica, consiste en mantener la viabilidad y funcionalidad celular por un periodo extendido de tiempo. En el proceso de criopreservación existen momentos críticos durante los cuales se producen eventos físico-químicos que son resultado del cambio de temperatura y el desplazamiento de agua a nivel intracelular que ocurre entre el embrión y el medio, procesos como el congelamiento y la descongelación deben efectuarse con la rapidez y adecuada metodología para garantizar la viabilidad del embrión. Bó et al (2008) menciona que los protocolos de criopreservación han sido diseñados con el fin de proteger a estas células de la formación de cristales de hielo a nivel intracelular durante el congelado y descongelado. para prevenir la formación de cristales de hielo, el agua intracelular es

reemplazada por crioprotectores permeables y los embriones son deshidratados a una tasa relativamente lenta de enfriamiento. (Bó et al.2008).

7.8.1. Crioprotectores

Los crioprotectores son compuestos químicos los cuales facilitan la preservación de células por un tiempo prolongado a bajas temperaturas (Belascoain.et al. 2010.). los crioprotectores son moléculas hidrosolubles y de baja toxicidad, estos compuestos disminuyen la temperatura a la que se produce la transición del agua de estado líquido a sólido, interactuando con las moléculas de agua al reducir su capacidad de formar enlaces entre ellas (Gil.2011).

Tipos de Crioprotectores.

La clasificación de los crioprotectores según Bó et al (2008) se presenta de la siguiente manera:

7.8.1.1. *Permeables o intracelulares de bajo peso molecular:*” metanol (PM=32,04), etilenglicol (PM=62,07), 1,2 propanediol (PM=76,10), DMSO (PM=78,13), 2,3 butanediol (PM=90,12), glicerol(PM=92,10) y otros alcoholes

7.8.1.2. *No permeables de bajo PM:* galactosa (PM=180,20), glucosa (PM=181,10), sacarosa (PM=342,30), tetralosa (PM=378,3), y otros azucares

7.8.1.3. *No permeables de alto PM (>50.000 Daltons):* polivinilpirrolidona, alcohol polivinilico, almidon hidroxietilico, hialuronidato de sodio y otros polímeros.)

7.8.2. Conservación de embriones

Un paso indispensable en la transferencia de embriones es la conservación temporal de los embriones recolectados de una donante antes de ser transferidos o congelados, ésta se realiza en un medio de Solución Buffer Fosfato (PBS), suplementado con 10% de suero fetal bovino que representa una fuente de proteínas que reduce la tensión superficial, favorece la sedimentación, evita que los embriones se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación, incorpora sustancias promotoras del crecimiento que favorecen su desarrollo, absorbe e inhibe metales pesados tóxicos que puedan estar presentes en el medio. La viabilidad embrionaria declina después de 12 horas. Belascoain, et al. (2010.) se recomienda transferir los embriones máximo 8 horas después del empajillamiento.

“Los embriones de bovinos mantenidos en un medio no nutritivo por un largo tiempo y a temperatura ambiente decrecen ampliamente su capacidad de desarrollo, este desarrollo puede ser preservado si los embriones se refrigeran de 0 a 4 °C por no más de 24 horas técnica denominada refrigeración la cual se efectúa vehiculizando los embriones en PBS envasados en pajuelas de 0.25 ml y colocadas en un refrigerador “(Belascoain,et.al.2010).

7.8.3. Técnicas de criopreservación

El proceso de criopreservación se clasifica en equilibrado y no equilibrado, según se utilicen técnicas que logren o no un equilibrio osmótico entre el medio y el agua intracelular antes de la congelación del embrión. (Belascoain, et al.2010)

7.8.3.1. Criopreservación en equilibrio

Las técnicas de criopreservación en equilibrio logran cierto equilibrio entre la tasa a la cual el agua sale de la célula (deshidratación) y la tasa a la cual el agua es incorporada a los cristales de hielo extracelular (Belascoain, et al.2010). la mayoría de los embriones de mamíferos se congelan por métodos convencionales utilizando crioprotectores permeables y con tasas de congelación lentas y de descongelado relativamente rápidas. (Bó et al.2008).

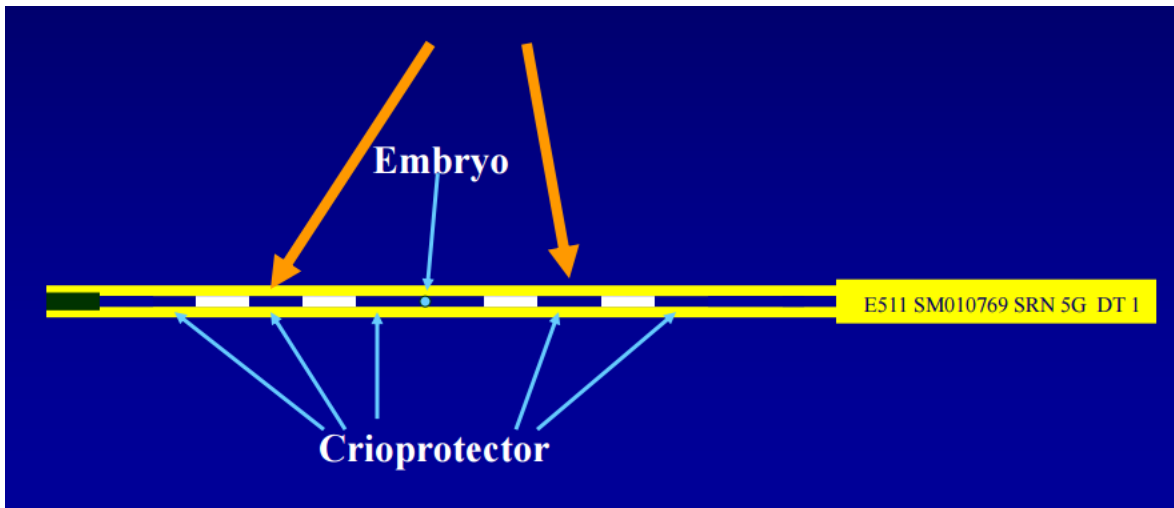
7.8.3.1.1. *Tradicional*: utilizados con más frecuencia crioprotectores permeables, como el glicerol y etilenglicol (Belascoain et al.2010).

Durante la fase inicial de preenfriamiento, los embriones se exponen a la presencia del crioprotector en una fase que denominamos de equilibración (Belascoain et al.2010), cuando el embrión se expone a crioprotectores inicialmente se encoge por la pérdida de agua a causa de hiper osmolaridad de la solución extracelular y porque el embrión es más permeable al agua que al crioprotector (Bó et al.2008), la contracción se detiene cuando se alcanza el equilibrio entre la salida de agua y la entrada del CP (Belascoain et al.2010), de esta manera el embrión aumentara nuevamente de tamaño y cuando la concentración de solutos fuera y dentro de las células llegan a un equilibrio (aproximadamente 10 minutos a 22°C para el glicerol y menos de 5 minutos para el etilenglicol) alcanzaran su volumen original. (Bó et al.2008).

Los procedimientos convencionales de congelado lento según Bó et al. (2008) incluyen los siguientes pasos:

- Exposición de los embriones a temperatura ambiente (22°C) a concentraciones molares de un crioprotector permeable de bajo peso molecular como el etilenglicol o el glicerol, hasta que se alcanza el equilibrio entre la solución crioprotectora y el embrión (Bó et al.2008), la duración de este periodo va a depender del crioprotector, el tiempo óptimo para el EG es entre 5 y 10 minutos y para el G es entre 10 y 20 minutos (Belascoain et al 2010.)
- Inducción de la formación de cristales de hielo (“seeding”) entre -5 y -7°C
- Descenso lento y controlado de la temperatura (0,3 a 1,0 C/min) hasta los -30°C o -35°C
- Colocación en nitrógeno líquido (N₂; -196 °C) donde puede permanecer almacenado indefinidamente
- descongelación controlada a alrededor de 250 °C/min (ej. Baño maría a 25°C)
- Remoción del crioprotector a temperatura ambiente
- Transferencia del embrión a una receptora

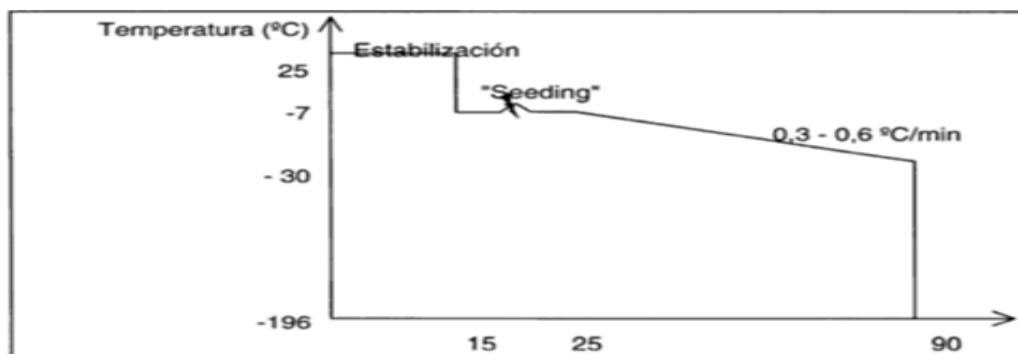
Ilustración 12. Punto en dónde se realiza el seeding.



Recuperado de: Bó y Rodríguez, (2012).

La congelación del embrión debe mantener la viabilidad del embrión al máximo y evitar la formación de cristales intracelular es que pueden llegar a destruir las células (Bó et al 2008.). al realizar el seeding (alrededor de 2°C debajo del punto de congelación del medio), ayuda a prevenir el superenfriamiento y los daños consecuentes del congelamiento rápido ocurridos debido a la formación rápida de núcleos de hielo (Duman 1982).

Ilustración 13. Tasas de enfriamiento utilizadas en la congelacion convencional de embriones bovinos



Recuperado de Palma, (2001)

“Contrariamente a lo que ocurre con la congelación, la descongelación de los embriones debe realizarse rápidamente (aproximadamente a 250°C/min) para evitar la recrystalización, para la descongelación se colocan las pajuelas con los embriones en agua tibia a una temperatura de entre 20 a 35 °C por 15 a 30 segundos (Bó et al 2008).

7.8.3.1. 2. *Transferencia directa*

Con esta técnica, la implementación de crioprotectores altamente permeables tales como el etilenglicol o el 1,2 propilenglicol es la mejor opción (Belascoain et al 2010.), los embriones bovinos son tan permeables a los glicoles que pueden ser transferidos directamente de una solución 1,6 M de propilenglicol a un medio isotónico sin sufrir ningún daño (Bo et al 2008.), de esta manera las pajuelas pueden ser descongeladas y el embrión es transferido directamente al grupo de las receptoras (Belascoain et al 2010). La criopreservación de embriones con etilenglicol para transferencia directa tiene una clara ventaja comparada con los métodos más tradicionales (Bó et al 2008). El uso de etilenglicol tiene ciertas desventajas también, debido a su nivel de toxicidad el procedimiento al momento de exponer los embriones a este crioprotector debe ser corto antes de la criopreservación. el protocolo de congelación y descongelación de embriones según Bó et al (2008) es el siguiente:

Congelación

- Clasificar los embriones (grado 1)
- Lavar los embriones según normas IETS y volver a clasificarlos
- Colocarlos en EG 1,5 M y cargar la pajuela (ver ilustración 11)

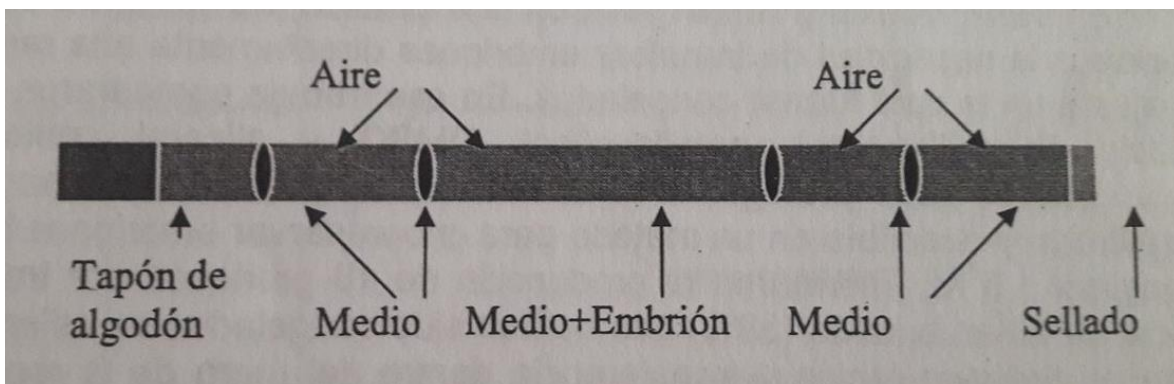
Tiempo: entre 5-10 minutos, dependiendo de la temperatura ambiente

- Colocar las pajuelas en la congeladora (-5 a -7°C) y dejar 1 a 2 minutos.
- Realizar el “seeding”
- Congelar a 0,6 °C por minuto hasta -35°C
- Sumergirlas en N₂

Descongelación

- Sacar la pajuela y colocarla en baño maría a 30°C hasta que se descongele la pajuela
- Secar la pajuela y transferir el embrión dentro de los 15 minutos de descongelado

Ilustración 14. Método para cargar un embrión en una pajuela de “transferencia directa” o “DT” (en una solución de etilenglicol 1,5 M)



Recuperado de: Bó, et al. (2008)

7.8.3.2. Criopreservación no equilibrada

7.8.3.2.1. *Vitrificación*

la técnica de criopreservación de embriones mediante el procedimiento tradicional es utilizada ampliamente, pero conlleva el uso de equipos de congelación y un estereomicroscopio, los cuales poseen un elevado valor en el mercado. Estos pasos pueden ser reemplazados por un procedimiento relativamente simple llamado vitrificación Rall & Fahy. (1985), La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración Belascoain et al (2010), casi todos los procedimientos de vitrificación de embriones se realizan en altas concentraciones de crioprotectores, alrededor de 6 M, de glicerol, etilenglicol, DMSO o mezclas de estas soluciones crioprotectoras MacFarlane & Forsyth. (1990). Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en NL no requiere más de 10 minutos. En condiciones prácticas, la vitrificación se logra mediante la inmersión directa en NL (Belascoain et al 2010).

El procedimiento de descongelación de los embriones vitrificados debe ser rápido, a baño maría (37°C), generalmente, los embriones descongelados se ponen inmediatamente en soluciones con mucha menos concentración de crioprotector más 0,5 a 1,0 M de sucrosa o galactosa para evitar que el agua ingrese a las células al diluir los crioprotectores Bó et al (2008).

7.9. SELECCIÓN DE RECEPTORAS

Reproductivamente hablando, una buena hembra receptora es capaz de recibir un embrión y permitir la gestación normal de esto hasta el día del nacimiento Albeiro, (1993). La receptora debe poseer un buen tamaño, ser sana en su totalidad y poseer buena capacidad lechera Albeiro, (1993), para poder parir sin grandes dificultades y alimentar al ternero.

El embrión, cuando es transferido, debe encontrar un ambiente uterino parecido al que estaba expuesto en el animal donante. De la fuente. (2001). el tener unas buenas receptoras garantizará el éxito o el fracaso del programa de T.E, cabe destacar que éstas deben ser animales de un buen tamaño, con una condición corporal óptima, sin parásitos y libres de enfermedades, sobretodo enfermedades de tipo reproductivo, si bien las receptoras no transmiten características genóticas al embrión, si es importante tener animales con buena capacidad materna, ya que esta es una característica que puede influir en el nonato, la docilidad de la receptora también juega un papel crucial, ya que una vaca inquieta, que no se deje manejar y que sea de comportamiento agresivo no garantizará una gestación adecuada. Los animales jóvenes, de buena conformación, con un buen historial reproductivo y con un balance energético positivo son ideales. De la fuente, (2001)

El tamaño de una hembra receptora se debe analizar según el tipo de embrión que se implantará, particularmente en las razas de carne, se busca un gran tamaño de ternero con pesos al nacimiento de 40 o 50 kg. Palma (2001). Intentar implantar embriones de razas de gran tamaño en receptoras de un tamaño mediano o pequeño, traerá como consecuencia la presencia de partos distócicos,

conllevando problemas éticos y económicos arriesgando tanto al nonato como a la receptora. El tiempo final de la gestación y el peso al nacer son dos factores determinados por la genética del embrión y no por la genética de la receptora. Albeiro, (1993).

7.9.1. Edad

“la vaquillona permite obtener tasas de preñez ligeramente superiores, sin embargo, los problemas de manejo durante la gestación, el parto y la lactancia pueden producir resultados finales inferiores a los de las vacas, contar con hembras receptoras propias en una producción es un trabajo que conlleva tiempo y constancia para obtener buenos resultados. El uso de vacas multíparas, con historia reproductiva conocida, que garantiza en cierta manera su comportamiento futuro, sumado al hecho de tener menos problemas de parto, hacen que éste sea finalmente el animal de elección”. (Albeiro,1993)

7.9.2. Examen clínico

El examen clínico tiene como objetivo chequear la condición general y reproductiva del animal, es importante que una receptora no presente abortos constantes y posea ciclos estrales regulares, ya que pueden ser indicios de enfermedades de tipo reproductivo como la brucelosis, la vacunación y desparasitación de rutina no se puede dejar de lado. Albeiro, (1993), propone detectar el calor dos veces al día, será revisada vía rectal siempre y cuando no presente celo durante 25 días. Resumiendo, el manejo adecuado de las receptoras incluye la selección de buenas hembras tanto reproductivas como productivas, libres de enfermedades y con una nutrición que supla sus requerimientos diarios. Palma, (2001).

7.9.2.1. Diámetro luteal de la hembra receptora

La evaluación reproductiva de los ovarios mediante la ultrasonografía pretende analizar las estructuras ováricas de la hembra receptora con el fin de brindar una clasificación según el diámetro del cuerpo lúteo, esta clasificación se divide en tres grupos según el diámetro folicular: CL mayores o iguales a 20 mm (CL 1), entre 16 y 20 mm (CL 2) y menores a 16 mm (CL 3). Torres & Godoy, (2014).

Tabla 6. Clasificación de los cuerpos lúteos (CL) según el diámetro luteal

| CL 3 | CL 2 | CL 1 |
|---------|------------|--------|
| < 16 mm | 16 – 20 mm | >20 mm |

7.9.3. Nutrición

Como se ha mencionado anteriormente sin una buena nutrición no puede existir reproducción, es por ello que la hembra receptora al igual que le donante debe tener una nutrición adecuada y balanceada que supla sus requerimientos nutricionales antes, durante y después de la gestación del embrión implantado. Una buena nutrición de la receptora se verá traducido en un buen calostro y este alimento es el más importante en las primeras horas del neonato Brito. (2010), permitiendo el

desarrollo normal reproductivo consecuente y la estabilización de ciclos estrales regulares, que faciliten el manejo reproductivo dado por parte del profesional, una condición corporal optima es clave para la presencia de ciclos estrales regulares. Por otra parte, una condición corporal muy elevada ocasionando un caso de sobrepeso tampoco es ideal, Ya que esto produce trastornos en la presentación del ciclo estral o la sincronización de celos, además produce distocias en los partos, trastornos de índice metabólico y de transporte, adicionado a esto un desarrollo mamario precario Brito (2012). Un aporte energético positivo es de vital importancia para la producción de hormonas esteroideas que intervienen directamente en aspectos como el celo, la ovulación, desarrollo del embrión y la posterior gestación. No es conveniente que las receptoras posean sobrepeso, pero si es conveniente que al menos 14 días previos a la transferencia de embriones, estén ganando peso. Córdova, (2011.)

7.10. PROTOCOLOS PARA LA SINCRONIZACION DE RECEPTORAS

La sincronización de la ovulación para la transferencia de embriones a tiempo fijo utiliza el mismo concepto que los protocolos desarrollados para IA, Bó et al. (2008) reporta un trabajo en donde utilizaron 200 vacas cruza Brahmán (1/4 a 3/4 Brahmán) que fueron divididas al azar en dos grupos. Las vacas en el grupo 1 (control) fueron sincronizadas con dos dosis de PGF (0.15 mg D (+) Cloprostenol, preloban, Hoechst, argentina) cada 14 días y observadas por síntomas de celo por 5 días después de la segunda PGF (Tratamiento tradicional), las vacas en el grupo 2 recibieron un CIDR combinado con 2 mg de EB y 50 mg de progesterona en el día 0, PGF en el momento de la remoción del CIDR-B (día 7 y 1 mg de EB a las 24 h (Día 8.) tabla 8.

Tabla 7. Índices de preñez en receptoras de embriones tratadas con CIDR-B y transferidas a tiempo fijo y receptoras sincronizadas con PGF y transferidas a los siete días de observado el celo.

| Grupo | N | Transf/trat | Preñ/transf | Preñ/trat |
|-----------------------|-----|--------------|---------------|--------------|
| Control – PGF c/14 | 100 | 60/100 (60%) | 32/60 (53,3%) | 32/100 (32%) |
| CIDR + (EB+P4) +EB | 100 | 59/100 (59%) | 37/59 (62,7%) | 37/100 (37%) |

Los porcentajes no difieren (P>0.6)

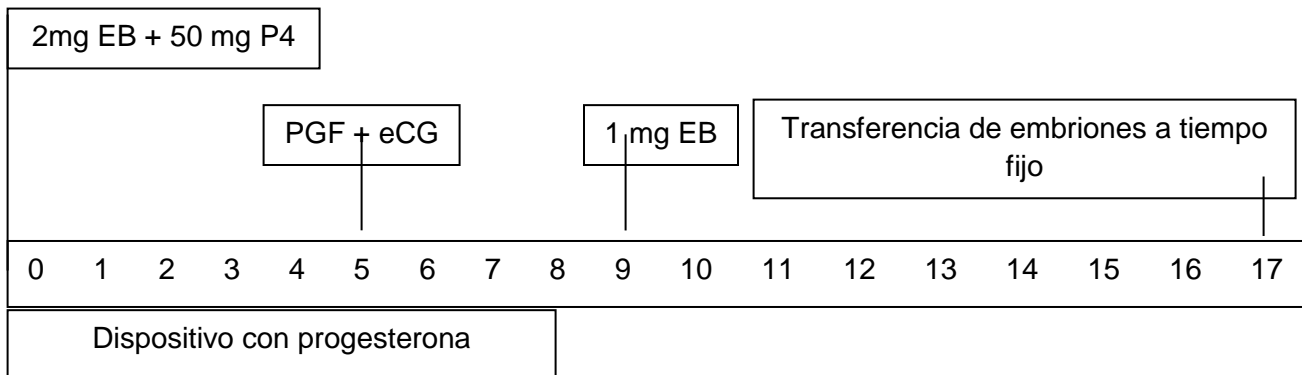
Estos resultados muestran que es posible adaptar los protocolos de sincronización de la ovulación utilizados en IA a esquemas de trabajo con receptoras de embriones y obviar el grave problema de la detección de celos. Bó et al (2008)

Tabla 8. Protocolo de sincronización hormonal ara receptoras en un programa de transferencia de embriones

| Día | Fecha | Hora | Actividad |
|-----|-----------|----------|--|
| 0 | 07-feb-15 | 10:00 am | P4(dispositivo intravaginal) + 2.0 mg de BE i.m. |
| 5 | 12-feb-15 | 10:00 am | PGF 2 mg. Im + eCG 2mg |
| 8 | 15-feb-15 | 10:00 am | Retiro dispositivo intravaginal |
| 9 | 16-feb-15 | 10:00 am | BE 1.0 mg. im. |
| 10 | 17-feb-15 | 06:00 am | Observar Celos |
| 10 | 17-feb-15 | 06:00 pm | Observar Celos |
| 16 | 24-feb-15 | | Transferencia de embriones |

P4 (dispositivo impregnado con progesterona (1gr) intravaginal); Sincrocio: (prostanglandina f2 α); folligon: (eCG)

Ilustración 15. protocolo de sincronización hormonal en receptoras.



Adaptado de: Bó.et al 2008

7.11. TRANSFERENCIA NO QUIRURGICA DE EMBRIONES BOVINOS

la transferencia de embriones por método transervical, es una técnica ampliamente usada en bovinos y requiere un material de trabajo mínimo (pistola cassou para IA, pipeta descartable plástica, pajuelas francesas de 0,25) Bó et al.(2008) .La hembra receptora es ubicada en el brete, luego se procede a realizar un chequeo vía rectal para localizar el ovario y verificar la presencia del cuerpo lúteo, también se aprovecha para realizar una evacuación de las heces, ya que el embrión se coloca en el cuerno uterino perteneciente al ovario que posea un cuerpo lúteo de buen tamaño clasificándose el cuerpo lúteo en una escala de 1-5 o según su tamaño en mm, a continuación se realiza la aplicación de la anestesia epidural caudal o baja con un analgésico local (lidocaína), esta inyección se coloca entre el sacro y la primera vertebra coccígea o entre la primera y la segunda vertebra coccígea, se utiliza aproximadamente 1 cm de lidocaína 2% por cada 100 kg de peso vivo, la aplicación de este analgésico tiene como función detener los movimientos peristálticos de la última porción del tracto digestivo del rumiante para facilitar la palpación y el manejo de la pistola

de transferencia durante el procedimiento, mientras la anestesia cumple su función se procede a descongelar el embrión y colocarlo en la pistola de transferencia, se descongela la pajilla de 0,25 con el embrión a baño maría (30°C por 20 segundos), posteriormente se retira el embrión del agua, se procede a secarlo cuidadosamente sin hacer movimiento bruscos, manejándolo siempre del plug o de las extremidades de la pajilla y evitando que le llegue luz directa, una vez bien seco, se retira el plug y se procede a colocarlo en la pistola de transferencia, se coloca la funda de transferencia y sobrefundas sanitaria, ya en la vaca es muy importante evacuar al animal rectalmente y limpiar muy bien la vulva para así introducir la pistola de transferencia, pasar el cérvix y llegar a la porción media del cuerno uterino, se comprime el embolo a una buena velocidad; posteriormente se procede a retirar la pistola. Según Bó et al (2008) la disposición del embrión dentro de una pajueta francesa (0,25 ml) es de la siguiente forma:

- Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo
- Aspiración de una burbuja de aire
- Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo
- Aspiración de una burbuja de aire
- Aspiración del embrión con un pequeño volumen de medio de cultivo
- Aspiración de otra burbuja de aire
- Aspiración de medio de cultivo hasta llenas la pajueta

8. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó bajo las medidas de las buenas prácticas ganaderas y bienestar animal, asimismo bajo las condiciones adecuadas propias de la empresa particular.

8.1. LOCALIZACIÓN

El trabajo se llevó a cabo en el año 2015 durante los periodos de julio–diciembre en la finca el Porvenir, municipio de san francisco Cundinamarca, vereda el bosque, terreno montañoso, altura sobre el nivel del mar 1200 msnm, temperatura 22°C, viento 0-8 kilómetros, precipitación anual 83 mm, humedad 58%.

8.2.GRUPO EXPERIMENTAL

De los 17 animales blon d Aquitaine entraron al estudio 5 hembras puras entre las edades de 18-24 meses y peso de 700-900 kg, condición corporal entre 3-4 (escala 1-5), a las cuales se les realizo un chequeo reproductivo por medio de palpación rectal para determinar la condición reproductiva y la ciclicidad de las mismas (CL)

8.3.CONDICIONES DE MANEJO

Los animales permanecían en potreros con pasto estrella, suplementados con silo de maíz y concentrado comercial, sal mineralizada y agua ad libitum.

8.4.INFRAESTRUCTURA Y EQUIPOS

corral, brete, cuarto con poca luz, formato transferencia de embriones, protocolos de sincronización (donantes-receptoras), mangas, guantes, dispositivo intravaginal Bovino (Sincrogest, 1gr. Ourofino, Brasil), aplicador, amonio cuaternario, estradiol (Benzoato de estradiol), sincrocio (prostaglandina), folligon (eCG), gestavec (Progesterona), folltropin (FSH), sincroforte (GnRH), jeringas de 10 ml, agujas de 18, jeringas de 20, estereomicroscopio, cajas de Petri, complete flush, lactato de ringer, sonda folley, sistema de conducción, cinta, catéter, holding, etilenglicol, congeladora, pistola de transferencia, fundas de transferencia, sobrefundas sanitarias, termómetro, cronometro, toallas de papel, agua.

8.5.TRATAMIENTOS APLICADOS PARA EL CONTROL DEL CICLO ESTRAL

Para realizar el estudio se implementaron dos tratamientos hormonales superovulatorios a base de estrógenos y progestágenos tomando un grupo de animales previamente chequeados y aptos para el procedimiento y sometidos a los tratamientos en periodos distintos del tiempo, aplicando un antes (tratamiento convencional de SOV (control)) y un después (tratamiento de +2 Días P4), obteniendo como resultado datos pareados. En los tratamientos se tomará el día 0 como el día de inicio del protocolo, teniendo al protocolo convencional con una duración de 15 días y el protocolo de +2 Días P4 con una duración de 17 días, el modelo utilizado en ambos trabajos sigue el modelo de transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF).

8.5.1. Protocolo convencional de superovulacion

Día 0: aplicación de dispositivo intravaginal bovino (Sincrogest - P4. 1 gr) + 2 gr de estradiol (benzoato de estradiol) intramuscular + progesterona inyectable (gestavec 2 mg i.m)

Día 4: aplicación de 2,5 mg de FSH (folltropin) im (A: M – P: M)

Día 5: aplicación de 2 mg de FSH (Folltropin) im (A: M – P: M)

Día 6: aplicación de 1 mg de FSH (folltropin) im (A: M – P: M) + prostaglandina F2 α (sincrocio 2 mg i.m)

Día 7: retiro del dispositivo intravaginal bovino (Sincrogest - P4. 1 gr) + aplicación de 0,5 mg de FSH (folltropin) im (A: M – P: M) + prostaglandina F2 α (sincrocio 2 mg i.m)

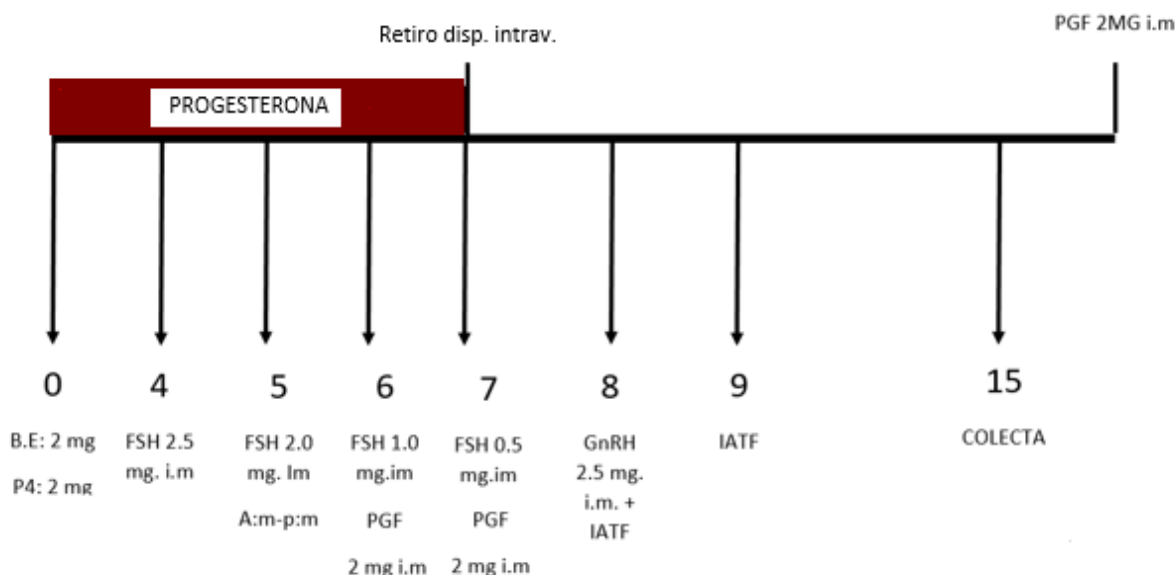
Día 8: GnRh (sincroforte 2.5 ml i.m) + I.A.T.F (2 pajillas)

Día 9: I.A.T.F (1 pajilla)

Día 15: colecta de embriones

Día 24: prostaglandina F2 α (sincrocio 2 mg i.m)

Ilustración 16. Protocolo de superovulacion convencional (control)



Autor.

El protocolo de superovulacion convencional utilizado en primer lugar tiene una duración de 15 días, contando el día cero como el día en donde se aplica el dispositivo intravaginal impregnado con 1 gramo de progesterona, 2 mg de estradiol (benzoato de estradiol) y 2 mg de progesterona inyectable, a partir del día 4 hasta el día 7 se suministra la hormona FSH (folltropin) A:M – P:M para estimular el desarrollo folicular a nivel de ovarios y así provocar la superovulacion, estas dosis serán en dosis decrecientes para tener mayor efecto en las etapas de reclutamiento y selección a nivel de ovario, los días 6 y 7 se suministraran dosis de prostaglandina para eliminar cualquier posible cuerpo lúteo que impida la ovulación, asimismo el día 7 se retira el dispositivo intravaginal y el día 8 se aplica una dosis de 2.5 ml de GnRh y se llevara a cabo la I.A.T.F , para ello se utilizan 3 pajillas de semen y se dejan en el útero, dos pajillas se implementan el día ocho del protocolo y la pajilla restante el día nueve. Para ello se puede realizar la inseminación con dos pajillas el día 8 y se vuelve a inseminar al día 9 con una sola pajilla para así abarcar un mayor rango de posibilidades para lograr fecundar más óvulos, seis días después se realiza la colecta de embriones en el día 15 para posteriormente clasificarlos y criopreservarlos.

8.5.2. Protocolo de SOV (+2 Días P4)

Día 0: aplicación de dispositivo intravaginal bovino (Sincrogest. ® - P4. 1 gr)

Día 2: 2 mg de estradiol (benzoato de estradiol) intramuscular + progesterona inyectable (gestavec 2 mg i.m)

Día 6: aplicación de 2,5 mg de folltropin im (A: M – P: M)

Día 7: aplicación de 2 mg de folltropin im (A: M – P: M)

Día 8: aplicación de 1 mg de folltropin im (A: M – P: M) + prostaglandina F2 α (sincrocio 2 mg i.m)

Día 9: aplicación de 0,5 mg de folltropin im (A: M – P: M) + prostaglandina F2 α (sincrocio 2 mg i.m)

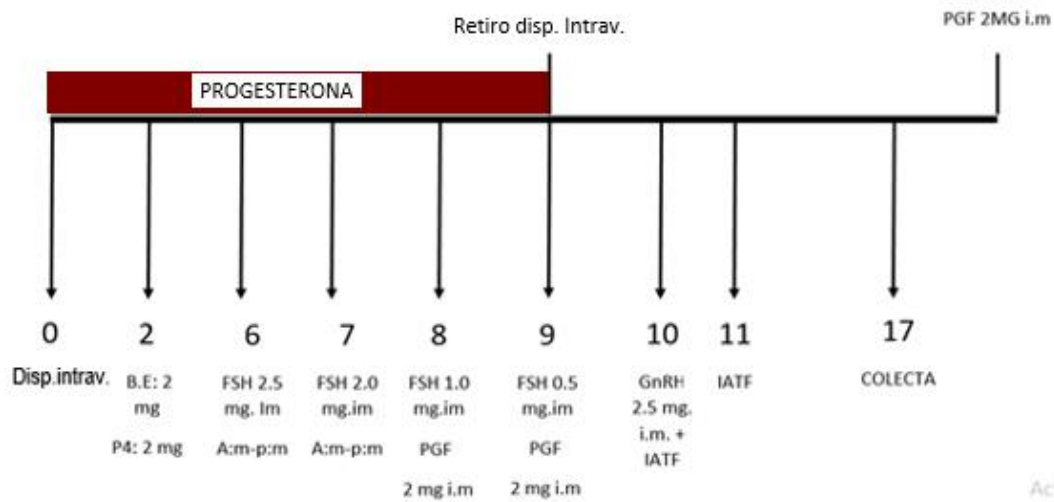
Día 10: GnRh (sincroforte 2.5 mg i.m) + I.A.T.F (2 pajillas)

Día 11: I.A.T.F (2 pajilla)

Día 17: colecta de embriones

Día 26: prostaglandina F2 α (sincrocio 2 mg i.m)

Ilustración 17. Protocolo de superovulacion +2 Días P4



Autor

Con este protocolo se propone la adición de dos días más con el dispositivo intravaginal, se cuenta el día cero como el día en donde se implanta el dispositivo y se retirara al día nueve, estos dos días adicionales buscan ejercer un *priming* de progesterona, la progesterona que ejerce un efecto negativo principalmente sobre la liberación de LH (Becaluba.2006).

8.6.DÍA DE LA COLECTA/RESULTADOS FINALES

Para la recolección de datos se utiliza el formato de colecta de embriones para poseer datos claros y claves sobre el número de estructuras obtenidas, el número de embriones viables bovinos y su catalogación según su estado de desarrollo y su calidad según la IETS, el número de embriones no fertilizados, anexo a esto se tomará nota sobre los animales que si respondieron o no ante el

tratamiento de superovulación bovina en el formato de colecta de embriones (Bó & Rodríguez 2006).

8.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se implementa una prueba t student de datos pareados para analizar el número y calidad embrionaria estableciendo el diseño estadístico de una misma población y la implementación de dos protocolos diferentes en distintas fechas, para evaluar de esta forma las diferencias de las medias de dos puntajes y analizar si son significativamente diferentes entre sí.

$$t = \frac{\bar{X}_D - \mu_0}{s_D / \sqrt{n}}$$

Para el análisis de costos, se manejarán los costos totales por animal del tratamiento superovulatorio, para ello se incluirán hormonas, materiales de trabajo, transporte y mano de obra.

9. RESULTADOS Y ANALISIS

Tabla 9. Resultado final de la colecta embrionaria implementando el tratamiento SOV convencional (Control).

| TRATAMIENTO CONTROL | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------------|-----------|-----------|--------------------------|---------------------------|-----------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-----------|-----------|-----------------|
| Colecta N°1 | | | | | | | | | | | | | | |
| Hembra | Total Estruct. | N° Cong. | N° T.E. | Total, embriones Viables | Clasificación embrionaria | | | | | | | Calidad 1 | Calidad 2 | Calidad 4 (DEG) |
| | | | | | Est.1 (Inf.) | Calidad 4 (DEG) | 4-1 Mórula | 4-2 Mórula | 5-1 Blast.T | 6-1 Blast. | 7-1 Blast.E | | | |
| Habana | 16 | 8 | 4 | 12 | 0 | 4 | 4 | - | 8 | - | - | 12 | 0 | 4 |
| Habba | 12 | 10 | 0 | 10 | 0 | 2 | 2 | - | - | - | 8 | 10 | 0 | 2 |
| Holanda | 10 | 5 | 0 | 5 | 4 | 1 | 5 | - | - | - | - | 5 | 0 | 1 |
| Ibiza | 13 | 0 | 0 | 0 | 4 | 9 | - | - | - | - | - | 0 | 0 | 9 |
| Isba | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | 0 | 0 | 0 |
| Colecta N°2 | | | | | | | | | | | | | | |
| Hembra | Total Estruct. | N° Cong. | N° T.E. | Total, embriones Viables | Clasificación embrionaria | | | | | | | Calidad 1 | Calidad 2 | Calidad 4 (DEG) |
| | | | | | Est.1 (Inf.) | Calidad 4 (DEG) | 4-1 Mórula | 4-2 Mórula | 5-1 Blast.T | 6-1 Blast. | 7-1 Blast.E | | | |
| Habana | 18 | 0 | 8 | 8 | 10 | 0 | 7 | 1 | - | - | - | 7 | 1 | 0 |
| Habba | 12 | 0 | 0 | 0 | 9 | 3 | - | - | - | - | - | 0 | 0 | 3 |
| Holanda | 11 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | - | - | - | - | - | 0 | 0 | 0 |
| Ibiza | 3 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | - | - | - | - | 3 | 0 | 0 |
| India | 24 | 5 | 10 | 15 | 5 | 4 | 15 | - | - | - | - | 15 | 0 | 4 |
| TOTAL | 119 | 28 | 25 | 53 | 43 | 23 | 36 | 1 | 8 | - | 8 | 52 | 1 | 23 |

Tabla 10. Resultado final de la colecta embrionaria implementando el tratamiento convencional modificado (+2 Días P4).

| TRATAMIENTO +2DP4 | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------|-----------|----------|--------------------------|---------------------------|-----------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-----------|-----------|-----------------|
| Colecta N°3 | | | | | | | | | | | | | | |
| Hembra | Total Estruct. | N° Cong. | N° T.E. | Total, embriones Viables | clasificación embrionaria | | | | | | | Calidad 1 | Calidad 2 | Calidad 4 (DEG) |
| | | | | | Est.1 (Inf.) | Calidad 4 (DEG) | 4-1 Mórula | 4-2 Mórula | 5-1 Blast.T | 6-1 Blast. | 7-1 Blast.E | | | |
| Habana | 10 | 7 | 0 | 7 | 3 | 0 | 3 | 2 | 2 | - | - | 5 | 2 | 0 |
| Habba | 31 | 15 | 0 | 15 | 3 | 13 | 11 | 2 | 2 | - | - | 13 | 2 | 13 |
| Holanda | 11 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | - | - | - | - | - | 0 | 0 | 0 |
| Ibiza | 11 | 8 | 1 | 9 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 3 | 1 | 8 | 1 | 0 |
| India | 15 | 15 | 0 | 15 | 0 | 0 | 5 | - | 10 | - | - | 15 | 0 | 0 |
| Colecta N°4 | | | | | | | | | | | | | | |
| Hembra | Total Estruct. | N° Cong. | N° T.E. | Total, embriones Viables | Clasificación embrionaria | | | | | | | Calidad 1 | Calidad 2 | Calidad 4 (DEG) |
| | | | | | Est.1 (Inf.) | Calidad 4 (DEG) | 4-1 Mórula | 4-2 Mórula | 5-1 Blast.T | 6-1 Blast. | 7-1 Blast.E | | | |
| Habana | 10 | 5 | 0 | 5 | 4 | 1 | 3 | - | 1 | 1 | - | 5 | 0 | 1 |
| Habba | 20 | 8 | 0 | 8 | 4 | 8 | - | 1 | 7 | - | - | 7 | 1 | 8 |
| Holanda | 6 | 2 | 0 | 2 | 4 | 0 | 2 | - | - | - | - | 2 | 0 | 0 |
| Ibiza | 7 | 6 | 0 | 6 | 1 | 0 | 6 | - | - | - | - | 6 | 0 | 0 |
| Isba | 11 | 11 | 0 | 11 | 0 | 0 | 6 | - | 5 | - | - | 11 | 0 | 0 |
| TOTAL | 132 | 77 | 1 | 78 | 32 | 22 | 38 | 6 | 29 | 4 | 1 | 72 | 6 | 22 |

9.1. NUMERO DE EMBRIONES

Mediante el análisis de la prueba t para datos pareados se puede observar unas medias no muy distintas para el tratamiento de +2 Días P4 y para el tratamiento control, con valores de 7,8 y 5,3 respectivamente, se llega a la conclusión de no rechazo de la hipótesis nula $P(T \leq t)$ (una cola) $> 0,05$, no existiendo diferencias significativas entre tratamiento.

Tabla 11. Análisis comparativo entre tratamiento implementando la prueba t para medias de dos muestras pareadas

| | <i>TT +2 Días P4</i> | <i>TT CONTROL</i> |
|--|----------------------|-------------------|
| Media | 7,8 | 5,3 |
| Varianza | 24,6222222 | 31,7888889 |
| Observaciones | 10 | 10 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,41144894 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 9 | |
| Estadístico t | 1,36816673 | |

| | | |
|--------------------------------|-------------------|--|
| P(<=t) una cola | 0,10222113 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1,83311293 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,20444225 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,26215716 | |

Las diferencias numéricas existentes entre tratamientos son de aproximadamente tres embriones por animal y 25 embriones en total; estos resultados suponen una mejoría importante tanto a nivel productivo como comercial, evidenciándose un efecto positivo en el tratamiento de SOV modificado (+2 Días P4) que supone la mejoría gracias al efecto provocado por el *priming* de P4 mediante la implementación del dispositivo intravaginal bovino previo al inicio del protocolo SOV (2 días adicionales).

El tratamiento convencional (control) muestra un número total de 53 embriones viables entre las calidades 1 y 2 según la IETS, con un promedio de 5.3 embriones por hembra bovina donante (10 Hembras). Realizando una observación en cuanto al total de estructuras recolectadas (119 estructuras) y comparándola con el total de embriones viables obtenidos, se puede llegar a la conclusión de que los 53 embriones representan un 44.5 % del total de las estructuras encontradas, el 55.5% restante se divide en estructuras degeneradas (23) con un 19.3 % y las estructuras infertilizadas (43) representan un 36.1 %.

El tratamiento convencional modificado (+2 Días P4) proporciona 78 embriones viables entre las calidades 1 y 2 según la IETS, con un promedio de 7.8 embriones por hembra bovina donante (10 hembras), al realizar un estudio comparativo en cuanto al total de estructuras encontradas (132) se tienen los siguientes resultados: los embriones ocupan un 59.1 %, el número de estructuras degeneradas (22) 16.6 % y el número de óvulos infertilizados (32) representan un 24.2 %.

Tabla 12. análisis de comparativo de resultados finales entre tratamientos (Control vs +2 Días P4)

| | TTO CONTROL | | TTO 2 D + P4 | | OBSERVACIONES |
|--------------------|-------------|--------|--------------|--------|-------------------------------|
| Total, estructuras | 119 | (100%) | 132 | (100%) | 15 estruct de más en +2DiasP4 |
| Embriones viables | 53 | 44.5% | 78 | 59.1% | 25 EMBRIONES. \$ |
| Degenerados | 23 | 19.3% | 22 | 16.6% | Disminuye en + 2Dias P4 |
| Infertilizados | 43 | 36.1% | 32 | 24.2% | Disminuye en + 2Dias P4 |

En cuanto al número de embriones, se presenta un incremento de 25 embriones con el tratamiento de +2 Días P4, es muy importante resaltar la importancia económica de embriones de la raza Blonde d' Aquitaine, encontrándose en el mercado precios que oscilan entre 1'200.000 – 1'400.000 por embrión. En cuanto al % de embriones degenerados se observa una disminución de

un 2.8 % favoreciendo al tratamiento de +2 Días P4, ocurriendo lo mismo con él % de óvulos infertilizados, reduciéndose un 12% y favoreciendo a este tratamiento modificado. Al realizar un breve chequeo sobre los animales que no presentaron respuesta favorable alguna al tratamiento (cero embriones viables), se observó los siguientes resultados:

Tabla 13. Hembras bovinas que no respondieron al tratamiento SOV control (cero embriones viables)

| | TRATAMIENTO CONTROL | | |
|---------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| | Total, estructuras | Ovocitos Infertilizados | Embriones Degenerados |
| Hembra bovina | | | |
| Ibiza | 13 | 4 | 9 |
| Isba | 0 | 0 | 0 |
| Habba | 12 | 9 | 3 |
| Holanda | 11 | 11 | 0 |

Total, hembras: 4

Dentro del tratamiento control, cuatro de diez hembras bovinas donantes de embriones no presentaron respuesta alguna al tratamiento superovulatorio (40 %), solo el 60 % de las hembras restantes dentro del tratamiento son responsables de la producción de 53 embriones viables, Isba es la hembra bovina la cual no brindo ninguna estructura embrionaria, correspondiente a una respuesta nula al tratamiento, las demás hembras produjeron estructuras divididas entre ovocitos infertilizados y embriones degenerados. (tabla 13). En el tratamiento +2 Días P4, Holanda es la hembra bovina la cual proporciona resultados desfavorables. El resto de las hembras bovinas (90 %) brindan mejores resultados.

Tabla 14. hembras bovinas que no respondieron al tratamiento SOV +2 Días P4 (cero embriones viables)

| | TRATAMIENTO +2 Días P4 | | |
|---------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | Total, estructuras | Ovocitos Infertilizados | Embriones Degenerados |
| Hembra | | | |
| Holanda | 11 | 11 | 0 |

Total, hembras: 1

La variabilidad de esta respuesta puede estar ligada a diversos factores (ambientales, manejo, calidad seminal). El tratamiento SOV modificado (+2 Días P4) favorece la respuesta superovulatoria debido a que nueve de diez (90 %) hembras bovinas presentaron una respuesta favorable al tratamiento (embriones viables); por otra parte, en el tratamiento control, seis de diez (60%) de las hembras bovinas presentaron una respuesta favorable al tratamiento representado en embriones viables. La sincronización hormonal es más eficiente siempre y cuando se inicie un

protocolo existiendo un CL activo y productor de P4 en el ciclo estral de la hembra bovina a trabajar, ya que de esta manera la sincronización de una nueva onda folicular y la atresia de la onda en desarrollo es más fácil mediante el uso de estrógenos y progestágenos, siendo un inconveniente que en un grupo de hembras bovinas no todas estén en la misma fase del ciclo estral, lo cual dificulta la sincronización eficiente, llegándose a presentar baja respuesta en protocolos SOV, el dispositivo intravaginal se implementa con el fin de que no exista la necesidad de un CL productor de P4 presente en el animal, de esta manera se produce un bloqueo hormonal (Duica,2010), la exposición a la P4 exógena de liberación lenta y su posterior declinación conocida como *priming* evita tener pérdidas reproductivas a causa de animales que no presenten una fase lútea al momento de iniciar el protocolo de sincronización hormonal, este concepto es reportado por varios autores los cuales hacen énfasis en la implementación del *priming* de P4 para mejorar la sincronización bovina relacionando los beneficios que conlleva la implementación de esta estrategia, ya que esta exposición a al P4 permite la diferenciación normal de las células de la granulosa y el desarrollo normal del CL. (Bó.,2004), (Martínez & Tribulo.,2010).

La variabilidad de la respuesta superovulatoria obtenida en colectas embrionarias es reportada por varios autores:

Tabla 15. Recopilación de resultados en cuanto a número embriones viables reportados por diferentes autores.

| Esquema hormonal | Embriones viables (promedio) | Referencia |
|---|------------------------------|-----------------------|
| Estrógenos + progestágenos | 8,8 | Pérez (2011) |
| Aspiración folicular + estrógenos y progestágenos | 10 | Pérez (2011) |
| eCG am 150UI pm 150UI | 6,9 | Garzón et al (2011) |
| eCG am 300UI | 8,3 | Garzón et tal (2011) |
| Estrógenos + progestágenos (vacas con registro) | 5,6 | Guerra et al (2007) |
| Estrógenos + progestágenos (vacas sin registro) | 4,8 | Guerra e tal (2007) |
| Estrógenos + progestágenos + folltropin (15 días) | 4,5 | Tribulo et al (2007) |
| Estrógenos + progestágenos + folltropin (16 días) | 4,0 | Tribulo et al (2007) |
| BE y progesterona | 6,8 | Carballo et al (2009) |
| Revisión de varios protocolos | 6.17 | Barros (2001) |
| Varios esquemas en donadoras | 5.0 | Chebel (2008) |
| Varias dosis de PMSG + anti-PMSG | 3.4 – 5.3 | Gonzales (1994) |
| Dosis variables de FSH | 2.1 – 4.7 | Walsh et al (1993) |

La variabilidad de la respuesta SOV es evidente al comparar los resultados obtenidos por diversos autores, los cuales van desde 2.1 hasta 10 embriones viables en promedio por animal, encontrando trabajos superovulatorios muy pobres en cuanto a esta variable y trabajos sobresalientes logrando hasta 10 embriones en promedio por vaca. En el desarrollo de este estudio se logra obtener 7.8 embriones bovinos viables en promedio por hembra donante, esto representa un buen logro por parte del tratamiento +2 Días P4, conociendo ya que únicamente el 45 % de las hembras donantes produce 4 o más (5) embriones viables (Jimenez.,2009), (Martínez.,2006).

La progesterona puede inhibir o favorecer la respuesta superovulatoria del animal mediante su influencia sobre los receptores de estradiol, dependiendo del tiempo de exposición. Es así como altas concentraciones de progesterona durante la fase lútea incrementan el número de receptores de estradiol en el hipotálamo medio-basal y por lo tanto incrementa la sensibilidad al estradiol. (Grajales,2010), de esta manera el estradiol proveniente del folículo dominante es percibido más fácilmente por el hipotálamo, lo cual permite liberar la hormona LH y generar así el conocido pico preovulatorio de LH mas fácilmente, de aquí la importancia de un priming de progesterona, ya que tiene acción directa sobre la presencia del celo y número de ovocitos producidos.

Dentro de los factores que pudieron influenciar la respuesta superovulatoria en cuanto al número de embriones viables bovinos, se considera al fuerte periodo de verano ocurrido entre tratamientos como el principal factor negativo. Si bien la raza blon de Aquitaine presenta una alta adaptabilidad y su escaso pelaje permite una mayor resistencia al clima tropical, la presencia de estrés calórico acompañado de una disminución en la cantidad y calidad del forraje disponible marcan cierto efecto en la respuesta final.

9.2.CALIDAD EMBRIONARIA.

la calidad de los embriones es muy relevante ya que puede verse traducida en porcentajes de preñez más elevados, así como reporta Arreseigor y col. (citado en Belascoain 2010.) donde obtuvieron porcentajes de preñez de 57,1% en los embriones de calidad pre-congelación excelente, 52,9% de los de buena y 31,2% en los de calidad regular. La comercialización de estas células germinales representa un sector amplio y productivo en el ámbito ganadero bovino del país, la facilidad del transporte es una de las ventajas que conlleva el criopreservar embriones de excelente y buena calidad representados con el grado 1 (escala 1-4), siendo el grado 1 la representación de un embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniformes, aceptándose pequeñas imperfecciones (irregularidades de las blastomeras),(Bó.,et al.2008).

Para el análisis de la calidad embrionaria entre tratamientos, se implementó una prueba t student para datos pareados, obteniendo medias para los tratamientos de +2 Días P4 y control de 7,2 y 5,2 respectivamente, la prueba demuestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos cuando $P(T \leq t) > 0,05$.

Tabla 16. Prueba t para muestras emparejadas – calidad embrionaria.

| | <i>TT +2 D P4</i> | <i>TT CONTROL</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media | 7,2 | 5,2 |
| Varianza | 22,1777778 | 31,2888889 |
| Observaciones | 10 | 10 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,39480192 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 9 | |
| Estadístico t | 1,10656667 | |
| P(T<=t) una cola | 0,14859005 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1,83311293 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,2971801 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,26215716 | |

Se evidencian diferencias numéricas de 2 embriones calidad 1 por animal, favoreciendo al tratamiento superovulatorio +2 Días P4, si bien no es una diferencia muy amplia, estos dos embriones por animal de más representan la posibilidad de poder comercializar un mayor número de embriones a nivel internacional y nacional, proporcionando genética de alta calidad. La calidad embrionaria encontrada al final de los tratamientos representa un buen logro ya que se presentaron embriones con grados de calidad 1 (excelentes y buenos) y 2 (regular) en ambos tratamientos, para el tratamiento control se encontraron 52 embriones de calidad grado 1; y solamente 1 embrión de calidad grado 2, en cuanto al tratamiento de +2 Días P4 se encontraron 72 embriones de calidad grado 1 y 6 embriones de calidad grado 2.

Tabla 17. Número y porcentajes correspondientes clasificados de acuerdo la calidad embrionaria según la I.E.TS entre tratamientos SOV (Control vs +2 Días P4).

| | CONTROL | | +2 Días P4 | | OBSERVACIONES |
|--|-----------------|---------------------------------|-----------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Nº Embriones | Porcentaje (53 Total. E.) | Nº embriones | Porcentaje (78Total.E.) | |
| Calidad grado 1 (excelente y bueno) | 52 | 98.1 % | 72 | 92.3 % | 20> calidad 1 en +2 Días P4 |
| Calidad grado 2 (regular) | 1 | 1.9 % | 6 | 7.7% | 6> calidad 2 en +2 Días P4 |

En cuanto al número de embriones de calidad grado 4 (muertos o degenerados), no se representan diferencias de gran importancia, el tratamiento SOV control reporta 23 embriones de calidad 4, mientras que el tratamiento SOV +2 Días P4, reporta un total de 22 embriones de esta calidad.

En un estudio realizado por Pérez (2011), donde evalúa la respuesta SOV en cuanto a calidad embrionaria con un protocolo tradicional a base de estrógenos y progestágenos reporta un total de 4.6 embriones promedio de calidad grado 1 y 4.1 embriones promedio de calidad grado 2. comparando estos resultados con el tratamiento +2 Días P4 se observa una diferencia importante de 2.6 embriones en promedio calidad 1 entre tratamientos, por otra parte, la presencia de embriones grado 2 en el protocolo +2 Días P4 es baja (0.6 embriones en promedio) en comparación (4.1 embriones promedio reportado por Pérez),

Castro y rodríguez (2014) reportan que las variables raza, tratamiento y estación, poseen un efecto determinante sobre la calidad embrionaria, siendo la época de verano responsable de influir negativamente sobre la producción de embriones calidad 1, 2 y 3 en comparación con otras épocas del año, el estudio de castro y Rodríguez (2014) evidencia resultados de 3,76 embriones calidad 1 en promedio y 5,08 embriones en promedio de calidad transferible (grado 2 y 3), siendo esta la respuesta más baja en comparación con otras estaciones del año. Ochoa (2009), corrobora esta idea, en donde al estudiar diferentes estaciones del año sobre la calidad embrionaria lograda provenientes de hembras donantes de raza cárnica, encuentra que el verano influye marcadamente sobre la producción de embriones calidad 1, con 4.26 embriones en promedio.

La débil respuesta embrionaria proporcionada por las hembras donantes en épocas o periodos cálidos puede estar relacionada con fallas en la ovulación debido al estrés calórico (Castro & Rodríguez,2014), aunque otra de las razones relacionada a esta respuesta es la equivocación al detectar cuerpos lúteos el día de la colecta confundidos con folículos luteinizados (Lozano et al., 2010). A diferencia de estos resultados Jiménez, (2009) reporta que durante el estudio hecho en Colombia en donde evalúa la producción embrionaria en un periodo de seis años, no encuentra una diferencia marcada sobre el número de estructuras recuperadas y la época del año, tomando en cuenta que Colombia al ser un país tropical que no presenta estaciones marcadas, pese a esto la presencia de fenómenos como el niño y la niña en Colombia, generan en muchas ocasiones y dependiendo de la geografía, periodos largos de sequía o de lluvias, generando ciertos inconvenientes tanto para los animales en cuestión como para los productores. Largos periodos de sequía, acompañados de una baja disposición de forraje rico en proteína y estrés calórico pueden conllevar a resultados pobres en hembras donantes de embriones si no se implementan alternativas nutricionales que generen un balance energético positivo en los animales. Los efectos de las condiciones climáticas influyen hasta cierto punto en la respuesta SOV, ya que las condiciones provocadas por el verano o el invierno son ampliadas o minimizadas dependiendo de la ubicación geografía del lugar en donde se realice el programa de transferencia de embriones (Bó y Mapletoft, 2014).

El buen manejo de los materiales al momento de la colecta embrionaria en el brete proporciona resultados eficientes y de elevada calidad embrionaria, el manejo dado a nivel del tracto rectal por medio de la palpación es muy importante, tratar la sonda Foley correctamente y realizar movimientos suaves con la mano teniendo como fin desprender los embriones del cuerno uterino utilizando la solución buffer-fosfato contribuye en gran medida a la obtención de un material genético en buenas condiciones, detalles como cubrir el filtro de colecta para evitar la acción directa de los rayos UV del sol y el implemento de materiales debidamente esterilizados contribuyen sustancialmente a la calidad embrionaria. El establecimiento del laboratorio de clasificación y criopreservación de embriones en una zona limpia, fresca y con buena sombra facilita el procedimiento y la calidad de estas células germinales.

9.3.COSTOS DEL TRABAJO DE SUPEROVULACION

Dentro del análisis de los costos correspondientes a los dos tratamientos superovulatorios (control, +2 Días P4), se toma en cuenta la parte de hormonal implementada, los elementos consumibles necesarios para realizar la colecta embrionaria, la mano de obra y el transporte.

Tabla 18. Costos del protocolo SOV control.

| Concepto | Present. Comerc. | Valor en el mercado | 1 hembra | Costo \$ | 10 hembras | Costo \$ |
|--------------------------------|------------------|---|----------|---------------------|------------|------------------|
| Superovulacion (sov) | | | | | | |
| Sincrogest | 10 un | 155.000 | 1 un | 15,500 | 10 un | 155.000 |
| Gestavec | 10 ml | 26.000 | 2 ml | 5,200 | 20 ml | 52.000 |
| Benzoato de estradiol | 100 ml | 46.000 | 2 ml | 920 | 20 ml | 9,200 |
| Folltropin | 20 ml | 380.000 | 12 ml | 228,000 | 120 ml | 2'280,000 |
| Sincrocio | 100 ml | 150.000 | 6 ml | 9,000 | 60 ml | 90,000 |
| Sincroforte | 20 ml | 60.000 | 2,5 ml | 7,500 | 25 ml | 75,000 |
| Total | | | | | | 2'661,200 |
| Colecta | | | | | | |
| Lidocaína 2 % | 50 ml | 14,000 | 5 ml | 1,400 | 50 ml | 14,000 |
| Holding | 8 ml | 21.000 | 1.6 ml | 4,200 | 16 ml | 42.000 |
| Ethylenglycol | 8 ml | 19.000 | 1,6 ml | 3,800 | 16 ml | 38,000 |
| Sistemas de conducción | 1 un | 42.000 | - | - | 4 un. | 168,000 |
| Filtros | 1 un | 60.000 | - | - | 2 | 120.000 |
| Lactato de ringer | 100 ml | 3.000 | 150 ml | 4,500 | 1500 ml | 45,000 |
| Vigro complete flush | 1000 ml | 61.000 | 90 ml | 5,490 | 900 ml | 54,900 |
| Jeringas 20 ml | 5 | 600 | - | - | 3,000 | 3,000 |
| Jeringas 10 ml | 5 | 500 | | | 2,500 | 2,500 |
| Escalerillas | 1 unid | 1.200 | 1 | 1,200 | 5 | 6,000 |
| Pajillas 0.25 mm | 1 unid | 300 | 5,3 | 1,590 | 53 | 15,900 |
| Total | | | | | | 509,300 |
| Mano de obra | | | | | | |
| Inseminación | 1 | 10,000 | 3 un | 30,000 | 30 un. | 900,000 |
| Colecta | 1 | 450.000 | 1 un | 450,000 | 10 un. | 4,500,000 |
| Criopreservación | 1 | 10.000 | 2,8 | 28,000 | 28 | 280,000 |
| Transporte | 1 km | 250 | 79 km | 19,750 | X 4 | 79,000 |
| Total | | | | | | 5'759,000 |
| Total, costos | | | | 8'929,500 \$ | | |
| subtotal embriones (53) | | | | | | |
| | | 8'929,500 /53 = 168,481 \$ por embrión. | | | | |
| Subtotal (10 hembras) | | | | | | |
| | | 8'929,500 /10 = 892,950 \$ por hembra donante. | | | | |

El costo total final del protocolo control es de 8'929,500 \$, dividiendo este valor entre el número de embriones viables obtenidos en la colecta embrionaria (53), se concluye que en la implementación del protocolo control cuesta 168,481 \$ producir cada embrión, los costos generales para lograr que las hembras bovinas donantes brinden este resultado es de 892,950 \$ cada una, tomando como referencia el valor comercial de los embriones de la raza Blonde D' Aquitaine (1'200.000) se logran obtener ingresos de 63'600.000 % , para lograr finalmente una ganancia neta de 54'670,500 \$

Tabla 19. costos generales del tratamiento SOV +2 Días P4

| Concepto | Present. Comerc. | Valor en el mercado | 1 hembra | Costo | 10 hembras | Costo |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------|--------------|-------------------|------------------|
| Superovulacion (sov) | | | | | | |
| Sincrogest | 10 un | 155.000 | 1 un. | 15,500 | 10 un. | 155.000 |
| Gestavec | 10 ml | 26.000 | 2 ml | 5,200 | 20 ml | 52.000 |
| Benzoato de estradiol | 100 ml | 46.000 | 2 ml | 920 | 20 ml | 9,200 |
| Folltropin | 20 ml | 380,000 | 12 ml | 228,000 | 120 ml | 2'280,00 |
| Sincrocio | 100 ml | 150.000 | 6 ml | 9,000 | 60 ml | 90,000 |
| Sincroforte | 20 ml | 60.000 | 2,5 ml | 7,500 | 25 ml | 75,000 |
| Total | | | | | | 2,661,200 |
| Colecta | | | | | | |
| Lidocaína 2 % | 50 ml | 14,000 | 5 ml | 1,400 | 50 ml | 14,000 |
| Holding | 8 ml | 21.000 | 1.6 ml | 4,200 | 16 ml | 42.000 |
| Ethylenglycol | 8 ml | 19.000 | 1,6 ml | 3,800 | 16 ml | 38,000 |
| Sistemas de conducción | 1 un | 42.000 | - | - | 4 un. | 168,000 |
| Filtros | 1 un. | 60.000 | - | - | 2 | 120.000 |
| Lactato de ringer | 100 ml | 3.000 | 150 ml | 4,500 | 1500 ml | 45,000 |
| Vigro complete flush | 1000 ml | 61.000 | 90 ml | 5,490 | 900 ml | 54,900 |
| Jeringas 20 ml | 5 | 600 | - | - | 3,000 | 3,000 |
| Jeringas 10 ml | 5 | 500 | | | 2,500 | 2,500 |
| Escalerillas | 1 unid | 1.200 | 1 | 1,200 | 7 | 8,400 |
| Pajillas 0.25 mm | 1 | 300 | 7,8 | 2,340 | 78 | 23,000 |
| Total | | | | | | 518,800 |
| Mano de obra | | | | | | |
| Inseminación | 1 | 10,000 | 3 un | 30,000 | 30 un. | 900,000 |
| Colecta | 1 | 450.000 | 1 un | 450,000 | 10 un. | 4,500,000 |
| Criopreservación | 1 | 10.000 | 7,8un | 78,000 | 78 un. | 780,000 |
| Transporte | 1 km | 250 | 79 km | 19,750 | X 4 | 79,000 |
| Total | | | | | | 6,259,000 |

| | |
|--------------------------------|--|
| Total, costos | 9'439,000 \$ |
| subtotal embriones (78) | 9,439,000 \$ / 78 =121,012 \$ por embrión. |
| Subtotal (10 hembras) | 9,439,000 \$ / 10 =943,900 \$ por hembra donante. |

La implementación del protocolo +2 Días P4 posee un costo final de 9'439,000 \$, al producir 78 embriones en este trabajo, los costos por embrión son de: 121,012 \$, y el costo de implementar este protocolo por animal es de: 943,900 \$, al calcular el precio de venta de los embriones (1'200,000) se obtiene un ingreso de 93'600,00 \$, finalmente la ganancia neta implementando el protocolo de +2 Días P4 es de: 84'161,000 \$.

Analizando los dos protocolos SOV, su implementación y resultados finales, se concluye:

En cuanto a los costos finales del programa SOV, el protocolo control posee un costo final de 8'929,500 \$ y un costo por animal de 892,950 \$, el protocolo +2 Días P4 posee un costo final de 9'439,000 \$ y por animal de 943,900 \$, siendo más económico el protocolo control por 509,500 \$ por tratamiento y 50,950 \$ por animal. Este valor de más requerido para el tratamiento +2 Días P4 representa el costo necesario para poder empacar y criopreservar los 25 embriones adicionales, obtenidos con el protocolo +2 Días P4.

Los costos por embrión revelan lo siguiente: el protocolo +2 Días P4 y el protocolo control presentan un costo de 121,012 \$ y 168,481 \$ por embrión respectivamente, presentándose un ahorro de 47,469 \$ por embrión favoreciendo al protocolo +2 Días P4.

Tomando como referencia el precio comercial de 1'200,00 \$ por embrión la ganancia neta del protocolo +2 Días P4 es de 84'161,000 \$, el protocolo control evidencia una ganancia neta de 54'670,500 \$. El protocolo +2 Días P4 proporciona una ganancia de 29'490,500 \$ de más, en comparación con el protocolo control, concluyendo que la implementación de un dispositivo intravaginal bovino impregnado con P4 posee un efecto importancia económica sobre la producción de embriones de calidad.

Bolívar y Maldonado (2008), realizaron un estudio mediante el cual analizaron los costos de varios esquemas de superovulación en Colombia, teniendo en cuenta el concepto de superovulación y la mano de obra requerida.

Tabla 20. Análisis de costos variables del esquema 1 de superovulación, sincronización de la receptora y mano de obra en Colombia

| Concepto | Presentación comercial | Valor | cantidad | Valor tratamiento \$ |
|----------------------------|------------------------|---------|----------|----------------------|
| Superovulacion | | | | |
| DIB | 10 unidades | 205,200 | 1 | 20,520 |
| Gestavec | 10 ml | 6,200 | 2 | 1240 |
| Benzoato de estradiol | 20 ml | 9,240 | 2 | 924 |
| Pluset | 10 ml | 236,900 | 20 | 473,800 |
| Lutalice | 10 ml | 21,600 | 4 | 8,640 |
| Fertagil | 5 ml | 18,350 | 2.5 | 9,175 |
| Cloprostenol | 20 ml | 72,200 | 2 | 7,220 |
| Subtotal SOV | | | | 521,519 |
| Embriones / lavado | | | | 6.3 |
| Subtotal por embrión | | | | 82,780 |
| | | | | |
| Mano de obra | | | | |
| Inseminación | | 20,000 | 3 | 60,000 |
| Jornales | | 16,053 | 4 | 64,210.5 |
| Veterinario | | 200,000 | 1 | 200,000 |
| Veterinario | | 200,000 | 1 | 200,000 |
| Subtotal mano de obra | | | | 524,210.5 |
| Embriones/lavado | | | | 6.3 |
| Subtotal/embrión | | | | 83,208 |
| Total/embrión transferible | | | | 203,095 |
| Total, trabajo | | | | |
| Total, superovulacion | | | | 521,519 \$ |
| Total, mano de obra | | | | 524,210.5 \$ |
| Subtotal | | | | 1'045,729.5 \$ |
| Embriones/lavado | | | | 6.3 un |
| Subtotal/embrión | | | | 165,989 \$ |

Adaptado de Bolívar y Maldonado (2008). Esquema de la sincronización del estro para la SOV de la donadora con progesterona (implante o dispositivo intravaginal), administración de dosis constantes de FSH (a.m. y p.m.) los días 9, 10, 11 y 12 del ciclo, retiro del implante y administración de prostaglandina el día 11, administración de LH e inseminación (a.m./ p.m. al inicio del estro y a.m. del día siguiente), con recuperación de los embriones (lavado) el día 7.

Los valores obtenidos para los costos de los diferentes protocolos de SOV, variaron en función del número promedio de embriones transferibles producidos por lavado (Bolívar y Maldonado, 2008) y a la cantidad de animales utilizados en el programa, la raza y el tamaño influyen también ya que de ello depende la cantidad de hormona utilizada sobretodo de la hormona FSH.

Tabla 21. Análisis de costos variables del esquema 2 de superovulación, sincronización de la receptora y mano de obra en Colombia

| Concepto | Presentación comercial | Valor | Cantidad | Valor tratamiento \$ |
|----------------------------|-------------------------------|--------------|-----------------|-----------------------------|
| Superovulacion | | | | |
| DIB | 10 unidades | 205,200 | 1 | 20,520 |
| Benzoato de estradiol | 20 ml | 9,240 | 2 | 924 |
| Pluset | 10 ml | 236,900 | 20 | 473,800 |
| Lutalice | 10 ml | 21,600 | 4 | 8,640 |
| Subtotal SOV | | | | 503,884 |
| Embriones / lavado | | | | 10.3 |
| Subtotal por embrión | | | | 48,920.8 |
| | | | | |
| Mano de obra | | | | |
| Inseminación | | 20,000 | 3 | 60,000 |
| Jornales | | 16,053 | 3 | 51,368.4 |
| Veterinario | | 200,000 | 1 | 200,000 |
| Subtotal mano de obra | | | | 311,368.4 |
| Embriones/lavado | | | | 10.3 |
| Subtotal/embrión | | | | 30,229.9 |
| Total/embrión transferible | | | | 126,817 |
| Total, trabajo | | | | |
| Total, superovulacion | | | | 503,884 \$ |
| Total, mano de obra | | | | 311,368.4 \$ |
| Subtotal | | | | 815,252.4 \$ |
| Embriones/lavado | | | | 10.3 un |
| Subtotal/embrión | | | | 79,151 \$ |

Adaptado de Bolívar y Maldonado (2008.). Las donadoras reciben el día cero un implante de progesterona junto con la inyección de benzoato (o valerato) de estradiol, seguido de la administración de dosis constantes de FSH (a.m./p.m.) los días 5, 6, 7 y 8, retiro del implante y administración de prostaglandina el día 7, administración de valerato de estradiol y GnRH el día 9 (a las 36 horas de retiro del implante), aplicación de LH e inseminación (AM/PM y AM del día

siguiente), al día del estro (a.m./p.m. al inicio del estro y a.m. del día siguiente), con recuperación de los embriones (lavado) el día 7 post I.A.

Tabla 22. Distribución comparativa entre los costos de los tratamientos SOV

| Componente de costos/ embrión /1hembra donante | Tratamiento control | Tratamiento + 2 Días P4 | Esquema 1 | Esquema 2 |
|---|----------------------------|------------------------------------|------------------|------------------|
| | Promedio embriones | | | |
| | 5.3 | 7.8 | 6.3 | 10.3 |
| Costo de SOV | 50,211 \$ | 34,117 \$ | 84,720 \$ | 48,920.8 \$ |
| Colecta emb. | 9,609 \$ | 6,651 \$ | N. R | N. R |
| Mano de obra | 108,660 \$ | 80,243 \$ | 83, 208 \$ | 30,229.9 \$ |
| Total | 168,480 \$ | 121,012 \$ | 167,928 \$ | 79,150.7 \$ |

Analizando los costos individuales por hembra bovina comparando los tratamientos trabajados en este proyecto y los reportados por (Bolívar y Maldonado, 2008) se puede apreciar, que los tratamientos más económicos por hembra bovina, son aquellos que produjeron un mayor número de embriones por animal, siendo estos el tratamiento + 2 Días P4 y el esquema 2 reportado por Bolívar y Maldonado (2008). concluyendo así que la mayor producción de embriones viables bovinos tendrá un efecto positivo sobre los costos requeridos para su producción.

10. CONCLUSIONES

- Se observa un incremento considerable en la producción de embriones bovinos viables aptos para criopreservar con el tratamiento de SOV +2 Días P4, concluyendo que el *priming* generado por el dispositivo intravaginal bovino impregnado con P4 posee un efecto positivo sobre la producción de embriones.
- El *priming* de P4 no tiene un efecto determinante sobre la calidad embrionaria lograda en este trabajo, la buena manipulación de los implementos necesarios al momento de la colecta, clasificación y criopreservación de embriones son procesos claves que influyen directamente la calidad embrionaria.
- La diferencia de costos entre tratamientos no difiere en gran medida (509,500\$) por tratamiento y (50,950 \$) por animal, siendo más económico el tratamiento control, pero generando menos embriones que el tratamiento +2 Días P4, los resultados económicos finales obtenidos por la comercialización de los embriones, justifica la implementación del *priming* de P4 como estrategia relevante en programas de SOV.
- un mayor número de embriones colectados al final del tratamiento superovulatorio influye positivamente sobre los costos finales de producción embrionaria por animal, siendo más económico el protocolo que genere más embriones viables por hembra donante.

11. RECOMENDACIONES

1. Seguir estudiando el efecto del *priming* de progesterona en protocolos de superovulación es relevante para la industria ganadera, realizar posteriores estudios en donde se evalúe diferentes tiempos de exposición exógena de progesterona (+5Dias P4, + 10Dias P4, +15Dias P4), tanto en animales *Bos taurus* y *Bos Indicus* de importancia genética y con un número más amplio de individuos que permita una distribución estadística más homogénea.
2. Al depender la calidad embrionaria de factores externos como los rayos UV y el tiempo de exposición desde la colecta embrionaria hasta la criopreservación/transferencia directa es indispensable realizar los procedimientos en el menor tiempo posible y contando con los materiales y lugar adecuados para el manejo correcto de esta biotecnología.
3. Cuando se utilizan crioprotectores para realizar la criopreservación de bajo peso molecular como el etilenglicol, se debe tener en cuenta el tiempo máximo de exposición a esta sustancia para que logre ser tóxico con las células embrionarias.

12. BIBLIOGRAFIA

13. Aké J., Millitza E. (1995). Respuesta superovulatoria en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* bajo condiciones tropicales, y efecto del desarrollo y calidad del embrión sobre el porcentaje de gestación. *Rev. mex. 26(3)*.
14. Albeiro R, H. (1993). Manejo de donantes y receptoras. En: Palma, G. transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción, 1993. Pag:9-12
15. Álvarez L. (2008). Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. *Arch Zootec 2008;57 (R):39-59*
16. Ball P, J., Peters A, R, (2004). *Reproduction in cattle, Great Britain*. Editorial Blackwell Publishing Ltd. third edition. Pag: 1
17. Barros C, M., Nogueira M, F. (2001). Embryo transfer in *Bos Indicus* cattle. *Theriogenology*; 56:1483-1496
18. Bazer F, W., Spencer T, E., Ott T, L. (1997). Interferon tau: A novel pregnancy recognition signal. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37:412-42
19. Becaluba F. (2006). métodos de sincronización de celos en bovinos, En: reproducción animal. pag.1
20. Belascoain M, G., Érica T., (2010). Técnicas para la criopreservación de embriones bovinos. Trabajo para optar al título de especialista en reproducción bovina, Córdoba –Argentina. Universidad Nacional de Córdoba- Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (IRAC). Pag:2-3
21. Belén A. (2011). protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones en bovinos. Universidad de cuenca. Pag:74
22. Bergfelt D, R. Bó G., Mapletoft R, J., Adams G, P. (1997). Superovulatory response following ablation-induce follicular wave emergence in cattle. *An reprod sci*;49:1-12
23. Betancourt J, F. (2011). Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales. Optando al título de Ingenieros Agrónomos en el Grado Académico de Licenciatura. Zamorano, Honduras. pag: 10
24. Biggers J. (1991). Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. centenary of his embryo transfer experiments. *reproduction & fertility ltd*, Pag:173-186
25. Bioniche, Animal Health. Citado el 9 de enero de 2016. Disponible en : <http://www.bionicheanimalhealth.com/productdetails.php?cat=7z2e0t8t4a2w&species>
26. Bó G. (2004). Bases fisiológicas y manejo del Anestro posparto en la vaca de cría. Memorias de “Segundas Jornadas Taurus de reproducción bovina, Herramientas para brindar un servicio profesional calificado”. Revista Taurus la revista de reproducción animal. Ediciones Taurus. Buenos Aires, Argentina. 7-19.
27. Bó G., Hockey D. Tribulo H. Jofre F., Tribulo R., Busso N., Barth A, D., Mapletoft R, J. (1991). The effect of dose Schedule and route of administration on superovulatory response to follitropin in the cow. *Theriogenology* 1991; 35:186 abs.
28. Bó G, A y Mapletoft R. 2014. historical perspectives and recent research on superovulation in cattle *theriogenology* 81:38-48.

29. Bó G., Caccia M. (2000), ultrasonografía reproductiva en el ganado bovino. Sitio argentino de producción animal. IRAC. pag:1-12.
30. Bó G., Mapletoft R, J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. EN: Anim. Reprod., v.10, n.3, p.344-348.
31. Bó G., (1988). Actualización del ciclo estral bovino. IV Jornadas Nacionales CABIA y I del Mercosur.
32. Bó G., Mapletoft., Tribulo A.(2008). Manejo reproductivo en rodeos de leche. Superovulacion y transferencia de embriones. Primera edicion, 4ta reimpression. Cordoba, Argentina, pag:3,4,55,75,109,128.
33. Bó G., Rodriguez P., (2012). Criopreservacion de embriones. (ppt) instituto de reproduccion animal de cordoba (IRAC). Cordoba-Argentina. 18 de junio del 2012. Ppt: 60
34. Bó G., Tribulo A., Ramos M., Carballo D, G., Tribulo H., Tribulo R., Baruselli P., Mapletoft R, J.(2010). Tratamientos simplificados de superovulacion en donantes y transferencia de embriones bovinos (ppt) . tranferencia de embriones- superovulacion. La Paz, Cordoba-Argentina.ppt-65.
35. Bó G., A., Carballo G, D., and Adams, G, P. (2008). Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. Theriogenology 69: 81-87.
36. Bó G, A., Tribulo A., Mapletoft R, J. (2011). Nuevos protocolos de superovulacion para programas de transferencia de embriones bovinos. EN: spermova. , 1(1): 26-33.
37. Bó G, A. (2002). dinámica folicular y tratamientos hormonales para sincronizar la ovulación en el ganado bovino. Cabrera, J.L. fisiología y reproducción. Simposio llevado a cabo en la facultad de ciencias agropecuarias, universidad católica de córdoba. córdoba, argentina.
38. Bolívar P, A., Maldonado J, G., (2008.). Análisis de costos de esquemas de transferencia de embriones bovinos utilizados en Colombia. Revista colombiana de ciencias pecuarias. 21:351-364
39. Breuel K, F., Lewis P, E., Inskeep E, K., Butcher R, L. (1993). Endocrine profiles and follicular development in early-weaned postpartum beef cows. J Reprod Fertil 97:205–212
40. Brito B, J. (2012) Manejo de receptoras en programas de transferencia de embriones a tiempo fijo. Trabajo de grado médico veterinario y zootecnista. Cuenca, Ecuador. Universidad de cuenca. Pag: 25
41. Calier. Citado el 21 de noviembre del 2015, disponible en: http://www.calier.com.uy/index.php?p=productos&busqueda_pal=pluset&busqueda_categorias=&x=0&y=0
42. Carballo D., Tríbulo A, L., Tríbulo P., Tríbulo R., Tríbulo H., Mapletoft R, J., Bó G, A. (2009). respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas durante la primera onda folicular o 4 días después de la aplicación de progesterona y estradiol. viii simposio internacional de reproducción animal – IRAC.
43. Castro D, G., Rodríguez D, A. (2014). Evaluación de factores que afectan la producción de embriones luego de un tratamiento superovulatorio en el ganado bovino en argentina. trabajo

final para optar al título de especialista en reproducción bovina. universidad nacional de cordoba.pag:17

44. Chebel R, C., Demetrio D, G., Metzger J. (2008). Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*; 69:98-106
45. Chenoweth P, J., (2007). Influence of the male on embryo quality. *Theriogenology*; 68 (3):308-315.
46. Chupin D, C.(1985). Different effect of LH on FSH-induced superovulation in two breeds of cattle. *theriogenology*, 23:184.
47. Colazo M, G., Mapletoft R, J. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos, *Ciencia veterinaria*, Vol. 9, N° 1, año 2007
48. Córdoba A. (2010). protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones en bovinos. Universidad de cuenca. Pag:30
49. Cuestas G, I., Brandan A., Chesta P. (2007). efecto de un *priming* de p4 sobre la tasa de ciclicidad en vaquillonas cruza indicas de 15 meses de edad.www.produccion-animal.com.ar. Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Córdoba 2007.
50. Cunningham J, G. (1997). *Fisiología veterinaria*. Interamericana McGraw-Hill.
51. Curran S., Pierson R, A., Ginther O, J. (1986). ultrasonographic appearance of the bovine conceptt. *Vet med Assoc*; 189,128-294
52. Davanço E., (2015). actualización en manejo reproductivo y usos de protocolos hormonales para mejorar parámetros en vacas de alta producción, conferencia llevada a cabo por Ourofino saúde animal
53. De la cruz V, M. (2014). Situacion actual de la criopreservacion de embriones bovinos.trabajo de grado medico veterinario y zootecnista.Torreon, coahuila, Mexico. Universidad autonoma agraria Antonio Narro. Pag:37
54. De la fuente J. (2009). reproducción asistida en el vacuno de leche: obtención y evaluación. Universidad de córdoba. Córdoba, mayo,2009.
55. De la fuente J. (2001). Transferencia de embriones en ganado bovino. En: reproducción bovina. C. González-Stagnaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. Cap.: XXIV.Pag:375-388
56. Dejarnette M., Nebel R.,(2016). Anatomia y fisiologia de la reproduccion bovina. Select sires. SS135-0106-5.0, citado el 11 de enero del 2016, disponible en:http://www.selectsires.com/dairy/spanresources/reproductive_anatomy_spanish.pdf
57. Del Valle, T. (2008), Dinámica folicular ovárica durante el ciclo estral en vacas doble propósito. *Desarrollo sostenible de ganadería doble propósito*.cap: XLIV.Pag:553
58. Dias F, C., Khan M, L., Adams G, P., Sirard M, A., Singh J.(2014) Granulosa cell function and oocyte competence: super-follicles, super-moms and super-stimulation in catle: animal reproduction science, publimed. volume 149, Issues 1-2, Pages 80–89. Imagen.
59. Dubby R, T., Frange R, W. (1996). Physiology and IRM-2 Endocrinology of the Estrous Cycle.IN: Dairy Integrated Reproductive Management, 1 of october.

60. Duica A. (2010). efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos. trabajo de grado maestro en ciencias. Bogotá D.C: Universidad nacional de Colombia. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Maestría en salud animal. Pag:23
61. Duman J, G. (1982). insects antifreezes and ice – nucleating agents. *Cryobiology* 19:613-627
62. FAO. (2010). conferencia técnica internacional de la FAO. Biotecnologías agrícolas en los países en desarrollo: opciones y oportunidades en los sectores agrícola, forestal, ganadero, pesquero y agroindustrial para hacer frente a los desafíos de la inseguridad alimentaria y el cambio climático. 1-4 de marzo del 2010. Guadalajara, México.
63. Forde N., Beltman M., Lonergan P., Diskin M., Roche J., Crowe M., (2011). Oestrus cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 163-169.
64. Galli C., Duchi R., Crotti G., Turini P., Ponderato N., Colleoni S., Lagutina I., Lazarri G. (2003) bovine embryo technologies. *Theriogenologia*, 59:599-616
65. García-Winder M., Lewis P, E., Deaver D, R., Smith V, G., Lewis G, S., and Inskoop, E.K. 1986. Endocrine profiles associated with life span of induced corpora lutea in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 62: 1353-1362.
66. Garzón J., Ramos M., Tribulo A., Tribulo R., Tribulo H., Bó GA., (2011). uso de eCG en el día 7 de un protocolo superovulatorio en vacas Bradford. ix simposio internacional de reproducción animal – irac.pag: 366
67. Gil A, R.(2011). Efecto del metodo de criopreservacion y de la blastoceleotomia sobre el desarrollo in vitro de blastocistos bovinos. Trabajo de grado maestro en ciencia animal. Veracruz. Universidad Veracruzana. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. 2011. Pag:54
68. González A., Wang H, Carruthers T, D., Murphy B, D. Mapletoft R, J. (1994). superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and anti-pregnant mare serum gonadotrophin serum. *can vet*; 35:158-162.
69. Gorosito R. (2007). Nutrición correcta en vacas donantes. *Revista Angus N* 238.Pag:20-24
70. Grajales H., Hernández A., Prieta E. (2010) Niveles de progesterona durante el ciclo normal y silencioso en bovinos en el trópico colombiano, May/Aug. 2010, *Rev.MVZ Córdoba* vol.15 no.2
71. Guerra G, A., Villareal J., Albrecht A., Brogliatti G. (2007). Respuesta ovárica y número de embriones en donantes superestimuladas con o respuesta ovárica y número de embriones en donantes superestimuladas con o sin registro de celo previo. vii simposio internacional de reproducción animal vii simposio internacional de reproducción animal – vii simposio internacional de reproducción animal – irac.pag:279
72. Gumen A, J., Guenther M., Wiltbank M, C. (2003). Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 86:3184-3194
73. Gutiérrez D., Báez G. (2014).la ultrasonografía en bovinos. *cucuta-colombia.*; 19(1):99-106

74. Gutiérrez D, E. (2012). Relación entre el folículo ovulatorio y la tasa de preñez en vacas lactantes. Tesis de Grado. Cúcuta. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. Universidad Francisco de Paula Santander. 2012. 57p
75. Guzmán M. (2002) Factores que afectan la superovulación en vacas. Monografía como trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia.
76. Hasler J, F., McCauley A, D., Schermerhorn E, C., Foote R, H. (1983) Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*; 19: 83.
77. Jahnke M., West J., Youngs C. (2015). Evaluation of in vivo-derived bovine embryos. En: *bovine Reproduction*, 1ª ed.2015.seccion III, capitulo 79 (733-748)
78. Jiménez C. (2009). Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en Bovinos. EN: *revista de medicina veterinaria y zootecnia*. 56:195-214
79. Lamb G, C., Smith S, M., Perry G, A., Atkins J, A., Risley M, W., Busch D, C and Patterson D, J. (2009) *Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle*. North Florida Research and Education Center, University of Florida.
80. Lane E, A., Austin E, J., and Crowe M, A. (2008). Oestrous synchronisation in cattle-Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 1-16.
81. Laster D,B., (1972). Disappearance of and uptake of (125I) FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. . *J Reprod Fertil*, 30:407-415.
82. López A, P., Gómez L, F., Ruiz Z, T., Olivera M., Giraldo C, A, (2008). Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino. *Analecta Veterinaria*;28(1):42-47
83. Lozano R, R., Asprón M, A., Vásquez C, G., González E., Aréchiga C, F. (2010). effect of heat stress on embryo production in superovulated cows and on the pregnancy rate in recipient cows. *rev. mex. cienc. pecu* 1(3):189-203
84. MacFarlane D, R and Forsyth M. (1990). Recent insight on the role of cryoprotective agent in Vitriification. *Cryobiology* 27:345-358.
85. Macmilan K, L., Peterson A, J. (1993). a new intravaginal progesterone releasing device fot cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrus. *Anim Reprod Sci*; 33:1-25
86. Maldonado J, G., Bolívar P, A. (2008). racionalidad de los esquemas de superovulacion y sincronización en la transferencia de embriones en bovinos: ¿terapéutica basada en la evidencia o ausencia de ética? Universidad de Antioquia, *revista colombiana de ciencias pecuaria*, 29 de agosto del 2008. 21:436-450
87. Mariana J, C. (1980). Some remarks on the long term trends and some short regulations in the follicular growth. 9th Inter. Cong. on Anim. Reprod. and A.I. Madrid, España. II: 79-94.
88. Martínez A, G. (2006). Optimización de métodos de criopreservación de embriones bovinos y ovinos, tesis doctoral, facultad de ciencias exactas y naturales, universidad de buenos aires, argentina.

89. Martínez M., Tribulo P. (2010). factores que afectan la edad de llegada a la pubertad en vaquillonas. Especialidad en reproducción bovina. IRAC.Argentina. Pag:7-8
90. Medeiros C, M., Forell F., Oliveira A, T., Rodríguez J, L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: ¿why isn't better? Theriogenology 57. Pág.327-344.
91. Morales JT, Cavestany D. (2012). Anestro posparto en vacas lecheras: tratamientos hormonales. Veterinaria (Montevideo) (SMVU). 48 (188) 3-11 (2012)
92. Moreno J. (2004). Transferencia de embriones en bovinos. Texas, EUA. 97p.
93. Moyano M,A., Rodriguez C, E.(2014). Suplementacion energetica y su efecto en el nivel de colesterol y perfil hormonal preovulatorio en vacas. EN: Revista de salud animal, Scielo. Vol.36, No.2. La Habana. Mayo-agosto,2014
94. MSD, Animal Health, citado el 9 de enero del 2016. Disponible en: http://www.msd-animal-health.com.pe/products/folligon/020_detalle_del_producto.aspx
95. Ochoa J, C., Ramírez R, A., Piccardi M, B., Bó G, A., Tribulo R, J. (2009). influencia de la estación en la producción de embriones en donantes de embriones de raza para carne. viii simposio internacional de reproducción animal-irac.
96. Ochoa J., (2011) Criopreservación de embriones bovinos. trabajo de grado médico veterinario y zootecnista. Cuenca, Ecuador. Universidad de Cuenca. Facultad de ciencias agropecuarias. Escuela de medicina veterinaria y zootecnia. Miércoles 15 de junio del 2011. 65 p.
97. Orellana, J., Peralta., Ever M. (2007). manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and sexing technologies. Trabajo de grado ingenieros agronomos en el grado academico de licenciatura. Zamorano, Honduras. Uiversidad de Zamorano. Diciembre del 2007. Pag: 56
98. Palma G. (2008). Biotecnología de la reproducción. 3a. ed. Argentina: INTA.
99. Palma G.(2001). Biotecnologia de la reproduccion. Primera edicion. Traducidos los capitulos 12 y 28 por German Khaiser. Argentina, octubre del 2001.
100. Peláez V. (2011). Producción in vitro de embriones bovinos. Trabajo de grado médico veterinario y zootecnista. Universidad de Cuenca, Cuenca-Ecuador.2011. Pag: 46, 47,48.
101. Pérez L. (2011). evaluación de la respuesta superovulatoria utilizando la ablación folicular como alternativa para la inducción del crecimiento de una nueva onda folicular en donadoras brahmán. tesis de especialización. Universidad nacional de córdoba. Argentina.pag:3
102. Peri P, L (2015). Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles: VII Congreso Internacional Sistemas Agroforestales - 1a ed. – Santa Cruz: Ediciones INTA, 2015. ISBN:978-987-521-611-2
103. Perry G. (2013) statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.IETS (International Embryo Transfer Society) Data retrieval committee. 25 de marzo del 2015, citado el 3 de septiembre del 2015. Disponible en: http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf
104. Pierson R, A., Kastelic J, P and Ginther O, J. (1988). Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses. Theriogenology 1988; 2

105. Quiaresma M, A., Lopes L., Robalo J., (2003). Superovulation of Mertolenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLTROPIN). *Revista portuguesa de ciencias veterinarias. RPCV* (2003) 98 (546) 81-84
106. Rafaelli P.(2013). bovinos de carne y bovinos de leche, reproduccion bovina, anatomia del aparato reproductor del macho, sincronizacion de celo, gestacion y parto. Edicion No 4. Universidad de belgrano, Buenos Aires, Argentina, 25 de junio del 2013.
107. Rajakoski E. (1960). The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol.*, 34:7-68.
108. Rall W, F and Fahy G, M. (1985). ice-free cryopreservation of mouse embryos at-196 degrees C by Vitrification. *Nature* 313:573-575
109. Rippe C.(2009). El ciclo estral. EN: The dairy cattle.martes 3 de noviembre del 2009. Pag: 111-116
110. Rivadeneira V.(2013) Ciclo estral bovino.sistema de revisiones de veterinaria de san marcos.21 de enero del 2013. Pag:
111. Rivera G, M., Goñi., Chaves M, A., Ferrero S, B., Bo G, A. (1998). ovarian follicular wave synchronization and induction of ovulation in post-partum beef cows. *Theriogenology* 1998; 49:1365-1376
112. Rivera. (2009), Revisión anatómica del aparato reproductor de las vacas. *The Dairy cattle. Minneapolis MN*. Pag:103-110
113. Roberts R, M., Ealy A, D, Alexenko A, P., Han C, S., Ezashi T. (1999). Trophoblast interferons. *Placenta* 1999; 20: 259–264.
114. Roche J, F., Boland M, P., (1991). Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology*, 1991, vol. 35, no 1, p. 81-90.
115. Rodriguez P., Jimenez C., (2011). criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Rev. Med. Vet. Zoot.* vol.58 no.2 Bogotá May/Aug. 2011
116. Rodríguez. (2001). mecanismos para el reconocimiento materno de la preñez en la vaca en: Soto C., H.E. 2001. Hemoparásitos en los procesos reproductivo. En: *Reproducción Bovina*. C. González-Stagnaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. Cap. XII: 171-186.
117. Salamanca O, L., (2012). La ganaderia colombiana en la nueva dinamica del comercio internacional. (el agro y la economica campesina frente a los tratados de libre comercio). (50 ppt) Universidad de los Andes, septiembre 4 del 2012.
118. Syntex, (2005) – Fisiología Reproductiva del Bovino. Laboratorio de Especialidades Veterinarias. Sitio Argentino de Producción Animal. www.produccion-animal.com.ar .Syntex, citado el 9 de enero del 2016. Disponible en: <http://www.syntexar.com/castellano/web%201024/index1024.php>
119. Torres J., Godoy K. (2014). efecto de la raza y el diámetro luteal sobre la tasa de preñez en novillas Holstein friesian y normando receptoras de embriones bovinos, IRAC-CGR. Bogotá, Colombia.

120. Tovia N., Duica A. (2012). factores relacionados con la dinámica folicular de la hembra bovina. volumen 8 / número 17 / julio - diciembre del 2012 / Revista s pei D omus.pag 43.
121. Tovia N., (2011) Efectos de la aplicación de eCG (Día 5 u 8) sobre el desarrollo del cuerpo lúteo, nivel de progesterona y tasa de preñez en hembras receptoras de embriones bovinos. Trabajo de grado magister en ciencias- salud y producción animal. Bogotá D.C. Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 2011.pag:
122. Tovia N., Duica A., Grajales, H. (2008) Desarrollo embrionario y estrategias antiluteolíticas hormonales en programas de trasplantes de embriones bovinos. EN: Revista MVZ Córdoba. Revista MVZ Córdoba, vol. 13, núm. 1, enero-abril, 2008, pp. 1240-1251
123. Tribulo A., Tribulo H., Tribulo R., Bó G, A. (2007). Efecto de la duración del tratamiento superovulatorio utilizando un dispositivo con progesterona y folltropin-v sobre la producción de donantes Angus y brangus. vii simposio internacional de reproducción animal – irac. pag:286
124. Troxel T, R., Kessler D, J. (1984). The effect of progestin and GnRH treatments on ovarian function and reproductive hormone secretions of anoestrous postpartum suckled beef cows. *Theriogenology* 1984; 21:699-711
125. UNAM. Citado el 11 de enero del 2016, disponible en: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/10ReproduccionBovina.pdf
126. Valladares J. (2010). Transferencia de embriones bovinos. Revisión. trabajo de grado médico veterinario y zootecnista. Timbaro, Michoacán: Universidad de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Julio del 2010. Pag:
127. Vélez M., Uribe L. (2010). ¿cómo afecta el estrés calórico la reproducción? Biosalud, Volumen 9 No.2, julio - diciembre, 2010 págs. 83 – 95
128. Walsh J, H., Mantovani R., Dubby R, T., Overstrom E, W., Dobrinsky J, R. (1993). the effects of once or twice daily injections of fsh on superovulatory response in heifers. *Theriogenology*; 40: 313-321
129. Yavas Y., Johnson W, H., And Walton J, S. (1999). Modification of follicular dynamics by exogenous FSH and progesterone, and the induction of ovulation using hCG in postpartum beef cows. *Theriogenology* 52: 949-963
130. Zeron Y., Tomczak M., Crowe J., Arav A. (2000). Electrofusion of bovine oocytes with different liposomes changes the membrane thermobehavior and reduces chilling sensitivity. *Theriogenology* 53: 267.

13. ANEXOS

anexo 1. Hembras blon d aquitaine, finca el porvenir, tomada por: Jhonatan castaño. Tomada el 22 de octubre del 2015



anexo 2 Laboratorio de clasificación y criopreservación armado, finca el porvenir, tomada por: Jhonatan castaño. Tomada el 22 de octubre del 2015



anexo 3 Implementos en brete para realizar colecta embrionaria, finca el porvenir; tomada por: jhonatan castaño, tomada el: 22 de octubre del 2015



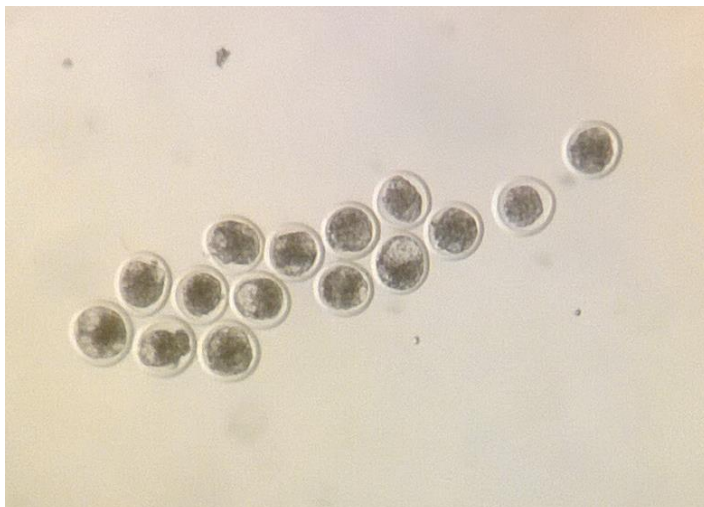
anexo 4. Doctor mauricio gonzales realizando el lavado embrionario, finca el porvenir, tomada por : jhonatan castaño, tomada el 22 de octubre del 2015



anexo 5. Procedimiento de clasificación embrionaria, Jhonatan castaño, tomada por: doctor Mauricio Gonzales, tomada el 22 de octubre del 2015.



anexo 6. Embriones resultados de una colecta embrionaria. Tomada por Jhonatan castaño, finca el porvenir, tomada el. 22 de octubre del 2015.



anexo 7 Procedimiento de empackado de embriones en escalerillas, tomada por jhonanta castaño, finca el porvenir, tomada el 22 de octubre del 2015.



