

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



“EFICIENCIA DE TRES PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN Y
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES A TIEMPO FIJO EN VACAS BROWN SWISS
PPC DEL CIP ILLPA – FCA UNA PUNO”

TESIS

PRESENTADA POR:

DANTE HERMES MARCA CHOQUECAHUA

PAUL ARACAYO MENDOZA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

MENCIÓN: ZOOTECNIA

PROMOCIÓN: 2010 – II, 2014 – II

PUNO - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“EFICIENCIA DE TRES PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN Y TRANSFERENCIA
DE EMBRIONES A TIEMPO FIJO EN VACAS BROWN SWISS PPC DEL CIP ILLPA –
FCA UNA PUNO”

TESIS

PRESENTADA POR:

DANTE HERMES MARCA CHOQUECAHUA
PAUL ARACAYO MENDOZA



PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO
MENCIÓN: ZOOTECNIA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 01 DE FEBRERO DE 2017

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE	:	 Ing. M.Sc. Julio Macario CHOQUE LAZARO
PRIMER MIEMBRO	:	 Ing. M.Sc. Luis Amilcar BUENO MACEDO
SEGUNDO MIEMBRO	:	 Dr. Félix Alonso ASTETE MALDONADO
DIRECTOR DE TESIS	:	 Dr. Javier MAMANI PAREDES
ASESOR DE TESIS	:	 Ing. M.Sc. Pablo Antonio BELTRÁN BARRIGA

PUNO - PERÚ

2017

Área: Ciencias agrícolas
Tema: Producción animal

DEDICATORIA

A Dios, por iluminar y guiarme por el camino de la sabiduría y esperanza para forjarme en la tierra como ser humano a imagen y semejanza.

A mis Amados padres, Acela y Esteban por mostrarme que tan fácil, sencilla y linda puede ser la vida con un poco de esfuerzo, persistencia y muchísima humildad.

A mis queridos y preciados hermanos, Yessy, Sandra, Carla, Pilar, Eddy y Omar, por su apoyo y ser uno de mis motivos para seguir en el camino de cumplir mis sueños.

Dante

A Hermelinda, mi madre; por su gran amor incondicional.

A Martín, mi padre; por su exigencia y constancia en mi desarrollo profesional.

A mis hermanos, Roxana, Javier, Danesa y Martín.

A mi amado hijo Paúl Andrés y su responsable madre Gris, por su apoyo en la culminación de mis estudios universitarios.

Paúl

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darnos la vida y por guiarnos en cada paso que damos ya que con él, todo es posible.

A la Universidad Nacional del Altiplano Puno, por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales y poder aportar en el desarrollo de nuestro país.

A la Decano, Ing. M. Sc. Rosario Ysabel Bravo Portocarrero, cuerpo catedrático y personal administrativo de la Facultad de Ciencias Agrarias, por todo el apoyo durante nuestra vida estudiantil y en la etapa de ejecución de tesis.

Agradecer de manera especial y sincera al Dr. Javier Mamani Paredes, por guiar y motivar la culminación de esta tesis. Su apoyo y confianza en el trabajo fue necesaria.

Al Ing. M. Sc. Julio M. Choque Lázaro, en gratitud a sus conocimientos y enseñanzas durante nuestra formación profesional.

Queremos extender un sincero agradecimiento al Ing. M. Sc. Luís A. Bueno Macedo, por su apoyo y disponibilidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento sobre la tesis.

Al Dr. Félix Alonso Astete Maldonado, por su apoyo en el desarrollo de la misma.

Al Ing. M. Sc. Pablo Beltrán Barriga, por su valiosa colaboración como asesor.

Al Director, Administrador y Personal Administrativo del Centro de Investigación y Producción Illpa, UNA-Puno, por el apoyo y colaboración durante toda la etapa de ejecución del trabajo.

Y, por supuesto el agradecimiento más profundo y sentido va para nuestra familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo.

Dante y Paúl

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA	13
2.1 Clasificación taxonómica de los vacunos	13
2.2 Fisiología de la reproducción.....	14
2.3 Endocrinología de la reproducción	15
2.3.1 Hormona de la reproducción bovina.....	15
2.3.2 Parámetros reproductivos de la vaca	20
2.3.3 Definición de transferencia de embriones.....	27
2.3.4 Por qué se realiza la transferencia de embriones?.....	29
2.3.5 Beneficios que ofrece la transferencia de embriones.....	30
2.3.6 Etapas de la transferencia de embriones	31
2.3.7 De las vacas donadoras	32
2.3.8 De las vacas receptoras	35
2.3.9 De la superovulación	39
2.3.10 De la inseminación artificial	43
2.3.11 Sincronización entre la donadora y la receptora	44
2.3.12 De la colección de los embriones	48
2.3.13 De la valoración y clasificación de los embriones.....	53
2.3.14 Del diagnóstico de gestación	55
2.3.15 De la conservación de los embriones.....	56
2.3.16 Resultados de la biotecnología	63
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
3.1 Localización del lugar de estudio	67
3.2 Características ecológicas.....	67
3.3 Características climáticas.....	67
3.4 Material experimental.....	68
3.4.1 Tipo de estudio.....	68
3.4.2 Vacas donadoras PDP.....	68
3.4.3 Vacas receptoras:	68
3.5 Metodología de ejecución experimental	71
3.5.1 Evaluación de vacas donadoras	71

3.5.2	Selección de vacas receptoras	73
3.5.3	Superovulación de las donadoras.....	74
3.5.4	Inseminación artificial de las vacas donadoras	75
3.5.5	Sincronización estral a receptoras de embriones	77
3.5.6	Colección de embriones.....	78
3.5.7	Donantes después de la colección.....	79
3.5.8	Aislamiento y búsqueda de los embriones del medio de colección	80
3.5.9	Valoración y clasificación de los embriones	80
3.5.10	Envasado del embrión en la pajuela.....	82
3.5.11	Conservación: refrigeración y congelación	83
3.5.12	Transferencia de embriones	85
3.5.13	Diagnóstico de preñez de vacas receptoras.....	87
3.5.14	Diseño de la escala de efectividad del programa de T.E.	87
3.6	Análisis estadístico	88
3.6.1	Diseño Experimental.....	88
3.7	Variables de respuesta y observaciones.....	89
3.7.1	Variables de respuesta evaluadas.....	89
3.7.2	Observaciones.....	90
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
4.1	Tiempo del retiro de protocolos (CIDR) en el proceso de la superovulación en vacas donadoras Brown Swiss PDP	91
4.1.1	Prueba de comparación múltiple Duncan ($Pr < 0.05$) para estimar la mejor hora de retiro de CIDR y mayor cantidad de embriones.....	95
4.2	Porcentaje de preñez en receptoras de embriones transferidas a tiempo fijo	97
4.3	Costo de producción y de transferencia de embriones por protocolo.....	98
4.3.1	Costo de producción de embriones	100
4.3.2	Costo de transferencia de embriones	104
	CONCLUSIONES.....	106
	RECOMENDACIONES.....	107
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
	ANEXOS	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de superovulación con FSH.....	42
Tabla 2. Protocolo de sincronización de la vaca donadora y sus receptoras.....	45
Tabla 3. Esquema de superovulación en bovinos	46
Tabla 4. Descripción cualitativa y clasificación de los embriones.....	55
Tabla 5. Promedios obtenidos como respuesta súperovulatoria.....	64
Tabla 6. Respuesta súperovulatoria con FSH.....	65
Tabla 7. Registro de donadoras de embriones.....	68
Tabla 8. Distribución de tratamientos de los factores en estudio	69
Tabla 9. Protocolo de superovulación de Donadoras P1 12 horas, modificado.....	74
Tabla 10. Protocolo de superovulación de donadoras P2 24 horas, modificado.....	75
Tabla 11. Protocolo de superovulación de donadoras P3 36 horas, modificado.....	75
Tabla 12. Protocolo de sincronización y transferencia de embrión a tiempo fijo en vacas – modificado.	77
Tabla 13. Clasificación general de los embriones colectados.	81
Tabla 14. Niveles de efectividad en la transferencia de embriones bovinos.....	87
Tabla 15. ANDEVA, Grados de libertad del diseño experimental (DCA) (Ibáñez 2009).	88
Tabla 16. Número de embriones, calidad de embriones y óvulos.....	91
Tabla 17. Cantidad de embriones viables obtenidos por cada protocolo y vacas donadoras.....	92
Tabla 18. Respuesta de los protocolos de superovulación, número de embriones obtenidos y datos transformados	94
Tabla 19. Análisis de varianza para estimar la mejor hora de retiro del dispositivo CIDR	96
Tabla 20. Prueba de Duncan al 95% para estimar la mejor hora de retiro de CIDR aplicando los tres protocolos.	96
Tabla 21. Porcentaje de preñez de vacas receptoras transferidas de embriones.	97
Tabla 22. Costos de producción de embriones transferibles por protocolo	99
Tabla 23. Costos variables de producción de embriones viables por protocolo	100
Tabla 24. Costos fijos de producción de embriones viables por protocolo.....	101
Tabla 25. Costos totales de producción de embriones viables por protocolo	102

Tabla 26. Costo general de transferencia de un embrión a una receptora.....	104
Tabla 27. Costo detallado de transferencia de un embrión a una receptora.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Donadora 1/ CDB ACE COLLECTION CAMELIA	72
Figura 2: Donadora 2 / DVC VASCO AYTOLA TORNINA	73
Figura 3: Donadora YRP COLECTION ZEUZ MELLISA.....	73
Figura 4: Introducción de la pistola de inseminación para la inseminación artificial a vaca donadora.	77
Figura 5: Sistema de colección de embrión	79
Figura 6: Embriones de calidad 1(a), calidad 2(b), calidad 3(c) y calidad 4(d)/clasificación por IETS 2004.....	82
Figura 7: Sistema del empajillado de un embrión (a) y tapón con registro del embrión (b). Modificado y adaptado de Di-Bella (2009).	83
Figura 8: Congeladora manual de embriones en proceso de congelamiento a base de nitrógeno líquido.....	84
Figura 9: Introducción de la pistola de transferencia de embrión en el útero.	86
Figura 10: Cuerno uterino y lugar donde queda depositado el embrión.	87
Figura 11: Cantidad de embriones de calidad 1, 2, degenerados y óvulos obtenidos por cada protocolo aplicado.....	93
Figura 12: Porcentaje de preñez de vacas receptoras transferidas de embriones.	98

RESUMEN

El presente estudio se desarrolló en el Centro de Investigación y Producción Illpa (CIP-Illpa), propiedad de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica - Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional del Altiplano Puno, ubicado a 19 Km de la carretera panamericana sur Puno - Juliaca, a una altitud de 3827, a 15°42'30'' de latitud Sur y 70°40'50'' de longitud Oeste, cuya temperatura promedio anual es de 8.4°C, la precipitación pluvial promedio anual es de 650 mm, y una humedad relativa de 42% con clima frío – seco en el distrito de Paucarcolla, provincia y región de Puno, ejecutada durante los meses de febrero del 2015 a marzo del 2016, 13 meses en su fase experimental. La investigación tuvo como objetivo: Evaluar tres protocolos de superovulación para la obtención de la mayor cantidad de embriones viables, determinar la cantidad y calidad de embriones producidos por las vacas donadoras aplicados con tres protocolos de superovulación, determinar el porcentaje de preñez en receptoras de embriones transferidas a tiempo fijo, y determinar los costos de producción y transferencia de embriones por cada protocolo. El estudio se desarrolló bajo las condiciones de manejo y alimentación en las que se llevan a cabo las explotaciones ganaderas del CIP - Illpa. Los resultados muestran que la respuesta ovárica después de la aplicación del primer protocolo de superovulación (S.O.) con retiro del CIDR a las 12 horas fue en las que las 3 vacas donadoras respondieron positivamente, y se obtuvo en promedio de 3.38 embriones viables de calidad 1; a la aplicación del segundo protocolo de S.O. con retiro del CIDR a las 24 horas, la respuesta en las 3 vacas donadoras fue mayor con un incremento notable en la cantidad de embriones con un promedio de 8.33 embriones viables y de calidad 1; mientras que en el tercer protocolo de S.O. disminuyó ligeramente la cantidad de embriones teniendo en promedio 5.17 embriones viables de calidad 1, lo que repercute directamente en los costos de producción, siendo menor los costos de producción de embriones mientras mayor cantidad de embriones se obtengan. A la evaluación de receptoras gestantes, se obtuvo el 63.83% de preñez en promedio, siendo la tasa de preñez 64.71, 63.16 y 63.64% para los protocolos P1, P2 y P3 con retiro del CIDR a las 12, 24 y 36 horas, respectivamente. Se concluye que la mejor hora de retiro del CIDR post aplicación de la prostaglandina es a las 24 horas, debido a que tuvo la mejor respuesta súperovulatoria en las que se obtuvo mayor número de embriones (8.33) de calidad 1.

Palabras clave: Donadoras, preñez, protocolos, receptoras, superovulación y transferencia de embriones.

ABSTRACT

The present study was carried out at the Illpa Research and Production Center (CIP-Illpa), owned by the Professional School of Agricultural Engineering - Faculty of Agrarian Sciences - National University of the Puno Altiplano, located 19 km from the Pan-American highway south of Puno - Juliaca, at an altitude of 3827, at 15 ° 42'30 "south latitude and 70 ° 40'50" west longitude, with an annual average temperature of 8.4 ° C, the average annual rainfall is 650 mm , and a relative humidity of 42% with cold - dry climate in the district of Paucarcolla, province and region of Puno, executed during the months of February 2015 to March 2016, 13 months in its experimental phase. The research aimed to: Evaluate three protocols of superovulation to obtain the largest number of viable embryos, to determine the quantity and quality of embryos produced by the donor cows applied with three protocols of superovulation, to determine the percentage of pregnancy in recipients of embryos transferred to fixed time, and to determine the costs of production and transfer of embryos for each protocol. The study was carried out under the management and feeding conditions in which CIP-Illpa livestock farms are carried out. The results show that superovulation (S.O.) with CIDR withdrawal at 12 o'clock was where the 3 donor cows responded positively, and an average of 3.38 viable embryos of quality 1 were obtained; to the application of the second S.O. with CIDR withdrawal at 24 hours, the response in the 3 donor cows was higher with a notable increase in the number of embryos with an average of 8.33 viable embryos and quality 1; while in the third S.O. the number of embryos has decreased slightly, with an average of 5.17 viable embryos of quality 1, which has a direct impact on production costs, the lower the production costs of embryos while the greater number of embryos are obtained. In the evaluation of pregnant recipients, 63.83% of pregnancies were obtained on average, with the pregnancy rate being 64.71, 63.16 and 63.64% for the P1, P2 and P3 protocols with CIDR withdrawal at 12, 24 and 36 hours, respectively . It is concluded that the best time for CIDR post-application of prostaglandin is at 24 hours, because it had the best superovulatory response in which a higher number of embryos (8.33) of quality 1 were obtained.

Key words: Donors, pregnancy, protocols, receptors, superovulation and embryo transfer.

I. INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones dentro de un planeamiento reproductivo se realiza sin dificultades en otros países, observándose como consecuencia el mejoramiento sustantivo de la producción ganadera; para mejorar la ganadería lechera en corto plazo en el Perú, sería necesario desarrollar esta biotecnología; por ello a través de esta investigación se pretende implementar un “Programa de Producción y Transferencia de Embriones en Vacunos” establecido con un protocolo tanto en la superovulación con la producción de buena cantidad y calidad de embriones en vivo y buen porcentaje de preñez en las receptoras, mostrando su efectividad, identificando y evaluando algunos factores que puedan impedirla y valorándola a través de indicadores.

Este avance acelerado en el proceso de la biotecnologías reproductivas va generando un aumento significativo de la productividad lechera y cárnica en ganado vacuno ya que se acorta sobre todo el tiempo de la mejora genética (9 meses) a comparación de otras tecnologías reproductivas así como la inseminación artificial (más 10 años). Lo que repercute en el incremento de la producción de carne y leche, generando mayores ingresos económicos al productor en muy corto tiempo.

Sin embargo, en nuestro país y otros con bajos recursos económicos aún no se desarrolla dicha tecnología ya que aparentemente aun pareciera ser costoso ya que se tiene menor porcentaje de preñez efectiva, menor cantidad de embriones viables y pocos profesionales calificados. Entonces, es necesario buscar la manera de hacer más eficiente esta tecnología que en consecuencia mejore la tasa de preñes efectiva y sobre todo la cantidad de embriones viables, lo que repercutiría en la disminución del costo en la aplicación y/o desarrollo de la producción y transferencia de embriones en vacas y además del interés tanto de profesionales y ganaderos.

Por las consideraciones expuestas, en el presente estudio de investigación se planteó como objetivo general de evaluar tres protocolos de superovulación para la obtención de la mayor cantidad y calidad de embriones viables, siendo los objetivos específicos los siguientes:

- a. Determinar la cantidad y calidad de embriones producidos por las vacas donadoras aplicados con tres protocolos de superovulación.
- b. Determinar el porcentaje de preñez en vacas receptoras de embriones transferidas a tiempo fijo.
- c. Determinar los costos de producción y de transferencia de embriones por cada protocolo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Clasificación taxonómica de los vacunos

Gasque (2008), reporta que la clasificación atómica de los vacunos es la siguiente:

Reino	:	Chordata
Sub Reino	:	Vertebrata
Clase	:	Mammalia
Sub Clase	:	Theria
Orden	:	Artioctyla
Sub orden	:	Ruminantia
Infra orden	:	Pecora
Familia	:	Bovidae
Género	:	Bos
Especie	:	<i>Bos taurus</i>
Sub especie o variedad	:	Tipicus.

Bo *et al.* (1995) mencionan que, a pesar de que los esfuerzos de investigación en los últimos años han dado lugar a poco o ningún aumento en el número de embriones transferibles después de la superovulación, los protocolos que controlan la emergencia de la onda folicular y el momento de la ovulación (Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006) han permitido el tratamiento de grupos de donantes, sea cual fuere la etapa del ciclo estral en que se encontraban, y ha permitido la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en donantes, sin necesidad de detectar celo.

Carril *et al.* (2008) sostienen que, el tratamiento más comúnmente utilizado para la sincronización de emergencia de la onda folicular para inducir la superovulación implica el uso de estradiol-17 β o uno de sus ésteres, que no pueden ser utilizados en muchos países debido a preocupaciones sobre los efectos de las hormonas esteroides en la cadena alimentaria.

Bueno (2012), en su guía de enseñanza universitaria manifiesta que, la biotecnología de la reproducción comprende de las técnicas desde la I.A. hasta la clonación, permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales. Es uno de los productos más emblemáticos de la investigación del control y dominio de las ciencias de la vida y es zootecnia porque logró aumentar con éxito el progreso genético de los hatos, destinados a la producción de leche, carne, lana, fibra y pelo, a través de las diferentes tecnologías aplicadas comercialmente desde mediados del siglo XX.

Así mismo estas técnicas tienen importancia porque pueden ser aplicadas además como herramientas de otras más modernas. Este es el caso de la I.A. en los programas de superovulación y T.E. con el empleo de la genética poblacional y de los métodos genéticos fue posible el desarrollo de exigentes programas de evaluación y selección de reproductores a través de su progenie. Finalmente menciona que, las biotecnologías reproductivas se distinguen de las técnicas génicas porque no alteran el genoma del animal, ya que tales técnicas génicas se ocupan de los genes en particular y no pertenecen a las biotecnologías de la reproducción (Albarracin, 1998).

2.2 Fisiología de la reproducción

Albarracín (1998), dice que el ciclo estral de la vaca está controlado por la secreción de hormonas del hipotálamo, apófisis, ovarios y útero. Estas son hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH) del hipotálamo, la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) de la hipófisis, estrógeno, progesterona e inhibina de los ovarios y la prostaglandina del útero.

Además (Albarracin, 1998), menciona que la destrucción del cuerpo lúteo en la vaca no preñada se produce entre los días 16 y 19 de su ciclo estral. El desarrollo folicular ovárico se caracteriza por la presencia de ondas de crecimiento folicular. Una onda ha sido definida como el desarrollo sincrónico de un gran número de folículos, seguido por la secreción y el crecimiento de un folículo dominante y la supresión de folículos subordinados. Durante el ciclo estral se produce el crecimiento de uno o dos folículos dominantes anovulatorios, previo a la maduración final del folículo ovulatorio.

El crecimiento y maduración del folículo preovulatorio provoca un incremento en la secreción de estradiol, el cual causa cambios estrogénicos en el oviducto y útero, comportamiento del celo, y la liberación preovulatoria de FSH y LH. El pico preovulatorio de LH provoca el reinicio de la meiosis, ovulación y luteinización del folículo ovulado para formar el cuerpo hemorrágico. El cuerpo hemorrágico se transforma

en cuerpo lúteo y provoca cambios en el oviducto y útero debido a la secreción de progesterona que permitirá el desarrollo embrionario y el establecimiento de la preñez. Si la preñez no ocurre, se destruirá el cuerpo lúteo y comenzará un nuevo ciclo estral.

2.3 Endocrinología de la reproducción

Hafez (1996), define la endocrinología como una sustancia fisiológica, orgánica, producida por células especializadas que pasa al torrente circulatorio para su transporte, con el objeto de estimular o inhibir la actividad funcional del órgano o tejido blanco. Muchas hormonas producen una amplia variedad de actividades, que controlan los procesos reproducidos se derivan principalmente de ciertas áreas del hipotálamo, hipófisis, gónadas, placenta y útero (Hafez, 1996).

2.3.1 Hormona de la reproducción bovina

2.3.1.1 Hormonas hipotalámicas

a. Oxitocina

Bó *et al.* (1998) indica que la oxitocina y la ADH (Hormona antidiurética), son dos hormonas peptídicas que sintetizan en el hipotálamo y se almacenan en la neurohipófisis. La vida media de la oxitocina es muy corta (menos de 5 minutos) ya que es degradada rápidamente por las peptidasas del hígado y riñón. Las funciones fisiológicas de la oxitocina son: la contracción de la musculatura uterina y modificación de los umbrales de excitabilidad del movimiento del útero.

Durante el parto, la oxitocina actúa en el proceso de expulsión del feto, la contracción de los vasos umbilicales y la contracción del útero después de concluido el parto para asegurar la hemostasis, también provoca el incremento de las contracciones del oviducto y de esta manera, interviene en el transporte, tanto de los gametos masculinos como de los femeninos. Los estrógenos facilitan la capacidad de reacción de la musculatura lisa a la oxitocina, mientras que la progesterona tiene un efecto inverso. Otra función de la oxitocina es la estimulación de las células mio-epiteliales de los alvéolos mamarios. Asimismo, se menciona que la oxitocina exógena ejerce una acción luteolítica en la vaca y la cabra (Albarracín, 1998).

b. Hormonas liberadoras de Gonadotropinas

Bó *et al.* (1998), dice que las sustancias que controlan la liberación de las hormonas hipofisarias fueron inicialmente denominadas factores de liberación. A medida que se conocieron sus estructuras químicas, se las ha llamado hormonas liberadoras y su abreviatura genérica es RH. La GnRH es un decapeptido (10 aminoácidos) con un peso molecular de 1.183 Daltons. Esta hormona induce la liberación tanto de la hormona luteinizante (LH) como de la hormona folículo estimulante (FSH) a partir de la hipófisis.

Además (Bó *et al.*, 1998) menciona que, la síntesis de un gran número de análogos estructurales de la GnRH ha tenido gran importancia en el establecimiento de las reacciones de estructura y actividad de esta hormona. Se ha sintetizado dos tipos básicos de análogos de GnRH. Los análogos antagonistas parecen unirse al receptor en la hipófisis pero induce la liberación de LH o FSH, y bloquea la acción de la hormona natural. Los estimulantes inducen la liberación de la LH Y FSH, al igual que la GnRH natural.

Finalmente (Bó *et al.*, 1998) resalta que, la función principal de la GnRH es inducir la síntesis y liberación de LH y FSH. Durante el ciclo estral la GnRH se va a secretar en pulsos.

2.3.1.2 Hormonas hipofisarias gonadotrópicas

La adenohipófisis secreta tres hormonas gonadotróficas: folículos estimulantes, luteinizantes y prolactina.

a. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Hafez (1996) y Bó *et al.* (1998), la hipófisis anterior secreta tres hormonas glucoprotéicas: la FSH, LH y TSH (Hormona Estimulante de la Tiroides). La vida media de la FSH va de 2 a 5 horas.

Bó *et al.* (1998), En la hembra la FSH estimula el crecimiento de los folículos en el ovario y participa junto con la LH estimulando la síntesis de: estradiol en los folículos en desarrollo. Las células de la granulosa son las que poseen receptores para la FSH, y producen además de estradiol otra hormona llamada inhibina que actúa junto con el estradiol suprimiendo la liberación de FSH por la hipófisis.

b. Hormona Luteinizante (LH)

Bó, *et al.* (1998), la LH es una glicoproteína compuesta por una sub-unidad de alfa y otra de beta con un peso molecular de 30000 Daltons y una vida media de 30 minutos los niveles tónicos o basales actúan con la FSH para inducir la secreción de estrógenos de los folículos ováricos. Además menciona que, las células de la teca interna contienen receptores para la LH y mediante su estimulación producen andrógenos, estos luego pasan a través de la membrana basal a las células de la granulosa, donde mediante la acción de la FSH se induce a la degradación de los andrógenos para transformarse en estrógenos. El pico preovulatorio de la LH induce una cadena de reacciones enzimáticas que terminara con la ruptura de la pared folicular y la ovulación. El pico preovulatorio induce la activación del ovocito para que continúe con la meiosis o estimulará la formación del cuerpo lúteo. La LH es la principal sustancia luteotrópica en animales domésticos.

c. Prolactina

Hafez (1996), menciona que es importante en ratas y ratones en donde posee propiedades luteotrópicas. Sin embargo en las especies domésticas la LH es la principal hormona luteotrópica y la prolactina es tal vez la de menor importancia. La prolactina interviene en la lactancia y actúa aparentemente a nivel de sistema nervioso central e induce el comportamiento materno.

2.3.1.3 Hormonas Gonadales

a. Relaxina

Hafez (1996), afirma que la relaxina es secretada por el cuerpo lúteo del ovario durante la preñez. En algunas especies la placenta y el útero también secretan relaxina. En condiciones fisiológicas, se obtienen muchos de efectos de la relaxina cuando el tejido blanco ha sido sensibilizado por los estrógenos.

La principal acción de la relaxina es la dilatación del cérvix y la vagina durante el parto. Al mismo tiempo menciona que, también inhibe las contracciones uterinas y provoca un incremento del crecimiento de la glándula mamaria si se aplica junto con estradiol. No existen productos comercialmente disponibles con relaxina (Albarracin, 1998),

b. Inhibina

Hafez (1996), menciona que, tanto la inhibina A como la B son inhibidoras de la secreción de FSH de la hipófisis, sin alterar la liberación de la LH.

Bó *et al.* (1998), menciona que, el mecanismo de acción (acción sistémica o de retroalimentación negativa) de la inhibina está aceptado mientras que todavía está en discusión si la acción más importante de la inhibina es a nivel general o a nivel local (en el Ovario).

c. Estrógenos

Hafez (1996), afirma que se encuentran sustancias con actividad estrógena tanto en animales como en plantas. El principal estrógeno que se secreta en el ovario es el estradiol 17β aunque estrona y estriol también son secretados en concentraciones menores. La producción de estradiol por parte del folículo es un proceso en el que intervienen tanto las células de la teca y de la granulosa, con el aporte de la LH Y la FSH en un mecanismo llamado de dos células, dos gonadotropinas. También hace mención que, cuando el folículo crece, la FSH inducirá además la síntesis de receptores para la LH en las células de la granulosa, aumentando aún más la producción de andrógenos que luego son transformados en estrógenos por parte del folículo dominante.

Además Hafez (1996), dice que de todos los esteroides, los estrógenos muestran las funciones fisiológicas más variadas: actúan en el sistema nervioso central para inducir el comportamiento del estro de la hembra. Los estrógenos actúan en el útero haciendo que aumente la masa del endometrio y miometrio. Tal aumento se debe a la hiperplasia celular y la hipertrofia. También hace que aumente la actividad y la frecuencia de las contracciones mediante la potenciación de los efectos de la oxitocina la prostaglandina $FG\alpha$. Los estrógenos estimulan el desarrollo de las características sexuales de la hembra.

Bó *et al.* (1998), los estrógenos ejercen efectos de retroalimentación negativa y positiva en el control de la liberación de LH y FSH, a partir del eje hipo tálamo hipofisiario. El efecto de retroalimentación positiva está íntimamente correlacionado con los niveles de progesterona circulante. Durante la fase Luteal, es decir cuando tenemos un cuerpo lúteo funcional y altos niveles de progesterona circulante, el efecto del estrógeno sobre la gonadotropinas es negativo, en cambio en la fase folicular (Luego de la luteólisis y cuando nos aproximamos al celo), al no

haber concentraciones altas de progesterona en sangre el estrógeno induce la liberación de la GnRH (pico preovulatorio de LH y FSH).

d. Progestágenos

Hafez (1996), menciona que la progesterona es el progestágeno que se presenta en mayor cantidad en forma natural, y es secretada por células del cuerpo lúteo, la placenta y las glándulas adrenales. También menciona que, la función de la progesterona es preparar al útero para la implantación y mantenimiento de la preñez, mediante el aumento de las glándulas secretoras del endometrio y la inhibición de su motilidad. Actúa en forma sinérgica con los estrógenos para inducir el comportamiento del estro en la oveja y de la vaca. Hace que se forme el tejido secretor (alvéolo) de la glándula mamaria. Concentraciones elevadas inhiben el estro y el pico ovulatorio de LH y afectará la frecuencia de los pulsos de LH, lo que hace evidente la importancia de esta hormona en la regulación del ciclo estral.

2.3.1.4 Hormonas uterinas

a. Prostaglandinas

Bó *et al.* (1998), afirma que, a diferencia de otras hormonas las prostaglandinas no se localizan en un tejido en particular. La mayor parte de ellas actúan en el sitio en donde son producidas, por medio de una acción parácrina aunque también, se las puede transportar en la sangre, para actuar en un tejido blanco lejos del tejido de producción, las prostaglandinas existen por lo menos en seis compuestos principales y numerosos metabolitos que tienen gran variedad de efectos farmacológicos, intervienen en la presión sanguínea la hipófisis, las secreciones gástricas, la coagulación de la sangre y otros procesos fisiológicos como la función renal y respiratoria.

Albarracín (1998), indica que las concentraciones sanguíneas de prostaglandinas son bajas, pero se elevan en ciertas condiciones como en el parto. Son degradadas rápidamente en la sangre y solamente después de su inyección en dosis farmacológicas pueden obtener efectos fisiológicos notables. Finalmente menciona que, todas las prostaglandinas son ácidos grasos no saturados de 20 carbonos. El ácido araquidónico es el ácido graso esencial, es el precursor de las prostaglandinas más relacionadas con la reproducción, en particular las prostaglandinas F_{2α} (PGF_{2α}) y la prostaglandina E₂ (PGE₂).

Bó *et al.* (1998), manifiestan que las PGF₂, tienen propiedades luteolíticas en animales domésticos. Si se retira de una vaca, cerda, oveja o yegua. El Cuerpo Lúteo no involucionará por lo menos durante el tiempo correspondiente a la gestación. El mecanismo durante el cual la PGF₂, llega del endometrio del útero al ovario en los rumiantes es único, ya que esta prostaglandina al ser liposoluble difunde las paredes de la vena útero-ovárica y pasa a la arteria ovárica y de ahí directamente al cuerpo lúteo. Esto es favorecido por la íntima relación existente entre la vena y la arteria de los rumiantes.

En animales domésticos, un incremento de los estrógenos que provoca un incremento en el crecimiento del miometrio del útero favorece la acción de la oxitocina, esta a su vez estimula la síntesis de PGF₂ α y su liberación. Además de la actividad luteolítica, la PGF₂ α estimula las contracciones uterinas, desempeña una función en el transporte de los espermatozoides, tanto en la hembra como en el macho y provoca constricción de los vasos sanguíneos. La otra prostaglandina de interés en la reproducción, la PGE₂, actúa durante el parto, estimula la contracción del útero, dilata el cérvix y los vasos sanguíneos y no tiene acción luteolítica, en realidad se cree que la PGE₂, tiene acción luteotrófica (Albarracín, 1998).

Hafez (1996), dice que la PGF₂ interviene localmente en la ovulación de la vaca. Puede bloquearse la ovulación mediante la administración de indometacina, que es un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. La liberación de LH no se afectará en estos animales, de tal manera que la acción y síntesis de prostaglandinas se realizan probablemente en el folículo ovárico.

2.3.2 Parámetros reproductivos de la vaca

2.3.2.1 Estro

McDonald (1971), manifiesta que durante la pubertad, surgen tipos rítmicos de conducta sexual. Este cambio de conducta (receptividad sexual) es llamado estro (del latín oistros que significa deseo imperioso, en términos populares se denomina celo) y tiene lugar en cada ciclo estral en las hembras sin estación reproductiva a menos que se interponga la preñez. En este periodo que es bastante definido comienza con la época de la primera aceptación y termina con la última aceptación del macho con duración media de 15 a 18 horas.

Salisbury (1964), dice, el ciclo estral o periodo de celo o estro es relativamente breve, dura sólo de 6 a 36 horas.

Holy (1986), los síntomas son numerosos y de diversa intensidad. Jugando en la reproducción dirigida un papel importantísimo ya que nos ayuda a seleccionar las hembras para el proceso reproductivo en el momento adecuado. Las hembras en celo se las llama también alzadas, en calor o en celo. Los síntomas principales son: se separan del rebaño observando a sus alrededores, hay mugidos, disminución del apetito, disminución de la producción de leche, busca, olfatea, persigue a otras vacas y reflejo de monta y fricción.

2.3.2.2 Fases del ciclo Estral

La clasificación más antigua del ciclo estral se divide en 4 fases:

a. Diestro

Callejas *et al.* (1996), menciona que en periodo de reposo sexual, dura aproximadamente nueve días, en los cuales se produce la involución del cuerpo lúteo suficientes de estradiol como para iniciar el celo y la descarga preovulatoria de LH.

b. Fase Preovulatoria (estro y metaestro)

Albarracin (1998), manifiesta que esta fase comienza con la receptividad al macho (hembra se deja montar por otras hembras y por el toro), e involucra todos los cambios que permite la ovulación y el comienzo de la formación del cuerpo lúteo, en este periodo se producen importantes fenómenos: inicio del celo, onda preovulatoria de gonadotropinas y ovulación. El intervalo entre el inicio de la luteólisis y comienzo del celo es 58 a 60 horas aproximadamente.

Según Albarracin (1998), los niveles de estradiol aumentan desde la regresión luteal hasta alcanzar los niveles máximos el día previo a la iniciación del celo. Dicha elevación de estradiol provoca el comportamiento propio del celo e induce la descarga preovulatoria de LH. Esta tiene una duración 6-10 horas, se inicia junto con el celo y alcanza su valor máximo (pico) 4 a 5 horas más tarde. Durante el pico preovulatorio, la descarga de LH sigue un patrón pulsátil. El estradiol actúa mediante los siguientes mecanismos para desencadenar la secreción preovulatoria de LH.

1. Aumenta la sensibilidad hipofisiaria al estímulo de la GnRH.
2. Aumenta el número de receptores para GnRH en las células hipofisarias.

3. Estimula la biosíntesis de gonadotropinas, dado el incremento que se observa en el contenido de ARNm para estas hormonas previo y durante la descarga de LH.
4. Aumenta el efecto preparador (self-priming effect) de la GnRH, eso es el proceso mediante el cual la GnRH incrementa la respuesta hipofisiaria a exposiciones sucesivas de la hormona.
5. Establece un mecanismo a nivel hipotalámico que culmina con la liberación de una descarga de GnRH, que a su vez induce el pico preovulatorio de Gonadotrofinas.

Así mismo Hafez (1996), hace hincapié en las funciones principales de la LH son la estimulación de la maduración folicular final, la activación del ovocito para que continúe con la meiosis (en profase 1, ovocito 1.) y el mantenimiento del cuerpo lúteo. La descarga preovulatoria de LH ocurre al comienzo del estro, concurrentemente con el pico de FSH.

Se cree que este pico de LH causa la ovulación e inicia la luteinización de las células de la granulosa y la teca. Generalmente la ovulación ocurre entre 24 y 30 horas después del comienzo de descargas preovulatoria de LH y FSH. El pico preovulatorio de LH produce nivel ovárico un aumento de riego sanguíneo, se disocia el cumulus oophorus y en consecuencia se deja de inhibir la meiosis y se elimina el primer corpúsculo polar. Se produce un aumento y cambio en la secreción de esteroides que se manifiesta por un aumento de síntesis de progesterona.

Esto produce edema y además, estimula la colagenaza de la teca que comienza a degradar el tejido conectivo que separa el folículo de la superficie ovárica y se inicia la formación del estigma (área extremadamente delgada del apéndice folicular). Otro cambio que se produce es el aumento de los niveles de $PGF2\alpha$, luego las contracciones ováricas provocadas por la $PGF2\alpha$ producen la ruptura del folículo, el cual se contrae por la misma $PGF2\alpha$ e impulsa el ovocito. Después de la descarga preovulatoria, no se detectan pulsos de LH durante 6-12 horas. Sin embargo la secreción de FSH continúa y se produce un segundo pico que se debe a la remoción de la retroalimentación negativa de la inhibina al destruirse su fuente de producción (Folículo) al producirse la ovulación.

c. Fase Luteal (Diestro)

Esta fase se caracteriza por el dominio del cuerpo lúteo.

Callejas (1996), después de la ovulación, las concentraciones de progesterona comienzan a elevarse en los días 3 o 4, alcanza un pico entre los días 8 y 12, y luego disminuyen hasta concentraciones basales antes del próximo estro, como consecuencia a la secreción uterina de PGF2 y en ausencia de un embrión viable en el útero.

Bó *et al.* (1998), dicen que el factor Luteotropico más importante en la vaca parece ser la LH, aunque también tiene participación la FSH.

Holy (1986), menciona que el cuerpo lúteo en su desarrollo máximo sobrepasa el volumen del folículo de graff y prolapsa en forma de botón amarillo sobre la superficie del ovario. La formación del cuerpo amarillo sobre la superficie del ovario es muy rápida, a los 4 o 6 días después de la ovulación es posible palparlo por vía rectal. El cuerpo lúteo alcanza su desarrollo máximo a la mitad del ciclo estral (9-12 días) y tiene entonces un color amarillo oro. Cuando el óvulo es fecundado, el cuerpo amarillo persiste como cuerpo amarillo de gestación y su función hormonal protege el curso de la gestación.

Bó *et al.* (1998), mencionan que cuando la ovulación pasa sin fecundación, el cuerpo lúteo, al acabar su desarrollo y funciones máximas involuciona y a los 16 días del ciclo estral comienza a perder su tamaño y su función hormonal. En animales viejos, las funciones del cuerpo lúteo declinan como consecuencia de:

1. Una incapacidad de las células foliculares (granulosa y teca interna) para responder completamente al estímulo hormonal.
2. Cambios en la cantidad, calidad o ambas en la secreción hormonal. Una reducción del estímulo para la secreción hormonal.

Hafez (1996), resume que la región del cuerpo amarillo se sucede por el reemplazo de las células luteínicas por células fibrosas y toma color amarillo claro, esta cicatrización recibe el nombre de cuerpo albicans, fibroso y cándidans.

d. Dinámica Folicular Ovárica

Callejas (1996), dice que durante el ciclo estral bovino los folículos se desarrollan y regresan en procesos ordenados llamados "ondas de desarrollo folicular". Se han descrito animales con dos, tres y cuatro ondas foliculares en el ciclo estral.

Bó *et al.* (1998), manifiestan que generalmente la primera onda comienza el día de la ovulación, mientras que la segunda, tercera y cuarta onda comienza en momentos muy variables. La dinámica folicular ovárica está principalmente regulada por la glándula pituitaria anterior, que controla la función ovárica a través de la síntesis y secreción de FSH y LH. La función principal de la FSH es estimular el crecimiento de ondas de folículos ováricos estrales. Las concentraciones de FSH en el suero o plasma aumentan hasta un pico 1 o 2 días antes del comienzo de una onda. Hay un gran pico más pequeño y secundario alrededor de las 24 horas más tarde que es la clave para iniciar la primera onda de crecimiento folicular.

e. Luteólisis

Bó *et al.* (1998), mencionan que, todavía existe controversia sobre el mecanismo de la luteólisis en el cual intervienen diferentes hormonas provenientes de los folículos ováricos (estradiol), el cuerpo lúteo mismo (oxitocina) y el endometrio (PGF2 α). Aparentemente, la clave para que ocurra la luteólisis está relacionada con la activación de receptores endometriales uterinos para la oxitocina por parte del estradiol.

El estradiol proviene del folículo dominante, interactúa con sus receptores endometriales e induce la síntesis de receptores para la oxitocina. Luego la oxitocina circundante (la cual proviene en primera instancia de la neurohipófisis y luego del cuerpo lúteo) se une sus receptores, activa la fosfolipasa A, libera el ácido araquidónico e induce la cascada sintética de araquidónico que lleva a la producción de PGF2 α uterina. La PGF2 α sale del útero por el sistema venoso y llega al ovario por el sistema arterial, estimula a su vez la liberación de oxitocina por el cuerpo lúteo, y la oxitocina luteal induce una secreción de PGF2 α por el endometrio y establece un feed back positivo entre ambas hormonas que conduce al aumento de los niveles de PGF2 α con la consecuente destrucción del cuerpo lúteo.

Este mecanismo de retroalimentación positiva de la oxitocina del cuerpo lúteo al ovario y de la PGF2 α del útero hacia el cuerpo lúteo sirve probablemente como un mecanismo para asegurar que la luteólisis ocurra.

1. Que al unirse la $PGF2\alpha$ con los receptores en las células luteales grandes induzcan una disminución de la secreción de progesterona induzca la lisis celular incrementando las concentraciones intracelulares de Ca^{++} . Este Ca^{++} llevará a la degradación de las células luteales a través de una estimulación de las endonucleasas que fragmentan el ADN.
2. Que ocurra por una combinación de las dos teorías anteriores.

Usualmente se dice que la $PGF2\alpha$ inducirá la luteólisis a partir del día 5 y se pensaba que estaba relacionado con la capacidad del cuerpo lúteo de sintetizar receptores de $PGF2\alpha$. No obstante se ha demostrado recientemente que la concentración y afinidad de receptores $PGF2\alpha$, altamente especializados en el Cuerpo Lúteo del bovino son similares en los días 2, 6 y 10 del ciclo estral.

2.3.2.3 Duración del ciclo estral

Albarracín (1998), aduce que los resultados de diversos trabajos que indican que el ciclo estral para la vaca es de 21 ± 3.68 días en vacas y más menos 2.33 días en novillas, pero que muchas hembras vuelven a entrar en celo a intervalos mayores o menores que el promedio esperado. Un informe al respecto señala que 30% de todos los ciclos estrales son menores de 17 o mayores a 25 días, y como regla general, cada vaca o vaquillona tienen su duración de ciclo personal. Es decir que existen pocas variaciones en la duración del ciclo en un mismo animal, pero existen mayores diferencias entre los ciclos de distintas vaca o vaquillonas.

2.3.2.4 Duración del periodo de Celos

Salisbury (1964), menciona que, el celo es de corta duración, con una media de 15, a 19 horas, estas variaciones se presentan en novillas, las cuales tienen un periodo de celo más corto que las vacas. Por otro lado, los animales que empiezan a presentar calores por la tarde, permanecen en tal estado 2 a 4 horas más que los que inician el celo por la mañana. La duración media del estro, tanto para vaca lechera como para la de carne es de 18 horas y se considera normales periodos de 12 a 24 horas. La duración media del estro parece que es sólo de 12 a 13 horas en vacas de razas europeas en un clima subtropical. La ovulación se produce de 10 a 12 horas de terminado el estro, tanto en vacas lecheras como en las de carne, considerándose normales los intervalos de 6 a 15 horas.

McDonald (1971), menciona que el comienzo del estro es un fenómeno gradual y resulta difícil identificar los momentos precisos en que realmente se inicia, ya que

depende de muchos factores, el principal de los cuales es el cambio de conducta de la hembra y el macho. La duración del estro suele basarse en el periodo de aceptación del macho. La raza y la temperatura ambiental pueden influir en la duración del estro. Diversos estudios más recientes demuestran que tanto el acoplamiento fértil, un servicio estéril y el acto de la Inseminación Artificial acortan la duración del celo.

Ortowski (1981), menciona que, naturalmente, una serie de factores influyen sobre la duración del estro. Uno de ellos, como ya se dijo, es el acoplamiento, otro es el estado de lactación de la vaca. Así se sabe que en vacas de razas para carne con cría al pie la duración del celo es menor que en vacas secas,

2.3.2.5 Dinámica folicular en el bovino adulto

Bó *et al.* (1998) mencionan que, los estudios que utilizaron la ultrasonografía para monitorear la población folicular en diferentes categorías por tamaño o folículos individualmente identificados han documentado convenientemente que el crecimiento folicular ocurre simulando ondas y que la mayoría de los ciclos estrales en bovinos comprenden dos o tres de dichas ondas. Además el patrón de ondas de desarrollo folicular ha sido documentado durante el comienzo de la preñez, más recientemente en terneras puberales. La dinámica folicular ovárica produce a través de estadios integrados de reclutación y dominancia folicular.

Este es un proceso recurrente, en el cual uno o dos folículos dominantes anovulatorios desarrollan, previo al folículo ovulatorio. El reclutamiento es un proceso en el que un conjunto de folículos antrales comienza a crecer en medio con suficiente soporte gonadotrófico que permita progresar hacia la ovulación. La selección es un proceso por el cual un folículo evade la atresia y adquiere competencia para alcanzar la ovulación (Hafez, 1996)

Albarracin (1998), dice que, la dominación es el medio por el cual el folículo seleccionado inhibe el reclutamiento de una nueva serie de folículos.

2.3.2.6 Ondas foliculares

Bó *et al.* (1998), dicen que una onda folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos. Está caracterizada por el desarrollo de un gran folículo dominante, el cual es anovulatorio si ocurre durante la fase luteal y ovulatorio si ocurre en la fase folicular; y varios folículos que invariablemente se atresian. Algunos investigadores han observado una preponderancia de ciclos de dos ondas,

mientras que unos indican una preeminencia de tres ondas, especialmente en ganado cebuino. Sí bien los factores que afectan el desarrollo folicular no han sido enteramente dilucidados se les atribuye factores como el nivel nutricional, especie, edad y anestro lactacional.

Para el patrón de dos ondas, la primera onda comienza, en promedio, el día 0 (Día de la ovulación) y la segunda comienza el día 10. Cada onda está compuesta de varios folículos individualmente identificables a partir de un diámetro de 4 mm., se describieron en el desarrollo del folículo dominante de la primera onda una fase de crecimiento (día 0 a 6), una fase aparentemente estática (día 6 a 12) y una fase de regresión (día 12 en adelante). El folículo dominante en la segunda onda es el ovulatorio y el diámetro máximo alcanzado no difiere de la primera onda (promedio 16 mm). Los folículos subordinados de cada onda incrementan su diámetro promedio de 8 mm tres días después de la emergencia de la onda, luego tienen una pequeña fase estática y luego regresan. Para el patrón de tres ondas, la emergencia de las ondas ocurre en promedio en los días 9 y 16 las dos primeras son anovulatorias (Albarracin, 1998).

2.3.3 Definición de transferencia de embriones

Asprón (1992), en su artículo “Transferencia de Embriones Bovinos - Biotecnología de Punta”, define a la transferencia de embriones bovinos, como una técnica para el mejoramiento genético del ganado vacuno, consiste en provocar que una vaca o vaquilla “donadora”, mediante un tratamiento hormonal e inseminación artificial con un toro probado con un alto valor genético, produzca varios embriones en siete días, después le son extraídos para ser transferidos a las receptoras, que previamente fueron sincronizadas con el calor de la vaca “donadora”. La receptora no transmite ninguna característica genética a la cría y solo sirve para mantenerla hasta el parto y durante la lactancia.

De Bem *et al.* (1994), en el artículo “Técnica de la Transferencia de Embriones”, definen a la transferencia de embriones como una biotecnología que consiste en una estimulación hormonal de los ovarios de la vaca apta como donadora, para inducir el desarrollo y maduración de varios folículos simultáneamente. Seis u ocho días después de la monta natural o de la inseminación artificial, los embriones son colectados a través de un lavado uterino y transferidos a vacas aptas como receptoras que llevarán la gestación a su término.

Henríquez *et al.* (1998), indican que, la transferencia de embriones bovinos consiste básicamente, en poner los embriones producidos por una vaca y un toro de alto valor genético en vacas cruzadas o corrientes, con el fin de que éstas desarrollen al embrión hasta el parto y sean las madres adoptivas de los becerros hasta el momento del deteste, adaptándolos al medio ambiente. En resumen, la transferencia de embriones bovinos es una herramienta reproductiva y comercial para los establos, la cual puede traer grandes beneficios económicos al ganadero, ya sea por medio del mejoramiento genético del mismo hato, o por la venta de los embriones a otros productores que quieran elevar la calidad de su ganado.

Palomino (2000), resume que, la transferencia de embriones consiste en tratar a las hembras genéticamente superiores, llamadas “Donantes de oocitos” con preparados hormonales comerciales para inducirles crecimiento y maduración folicular múltiple y ovulaciones de un número mayor de oocitos que lo normal, este proceso se denomina superovulación. Estos oocitos una vez fecundados *in vivo*, empleando semen también de alto valor genético, son recuperados mediante lavados del útero de las donantes para su examen en el laboratorio.

Los embriones jóvenes de 6 a 9 días de edad, son evaluados y seleccionados para su implante definitivo en hembras de escaso valor genético pero de buen historial reproductivo correctamente sincronizadas, llamadas receptoras de embriones, que son a manera de incubadoras biológicas, donde se desarrollarán normalmente hasta el término de la gestación. Sin embargo durante los últimos años el procedimiento de transplante embrionario ha evolucionado tremendamente, simplificando las maniobras, reduciendo los costos, y con el uso de técnicas no quirúrgicas para el implante, muy parecidas a las empleadas en la inseminación artificial hace que su aplicación en condiciones de campo muestre resultados muy satisfactorios, cuando se tiene disponible un abastecimiento adecuado de embriones congelados (Hafez, 1996).

Luna del Campo (2006), define a la transferencia de embriones como el transplante de un embrión de una buena vaca particular y un buen toro, al útero de otra vaca receptora (incubadora). Básicamente el proceso consiste en tratar las vacas donantes con hormonas que inducen la maduración y ovulación de un número mayor de folículos, es decir; realizar el tratamiento superovulatorio; en el momento del celo, la donante recibe servicio natural o inseminación artificial con el toro superior elegido.

Los oocitos una vez fecundados *in vivo* e iniciado el desarrollo embrionario, entre los días 6 y 8 después de la inseminación, son colectados de la cavidad uterina de la donante, aislados y luego transferidos al cuerno uterino de vacas receptoras sincronizadas, que estuvieron en celo 6 a 8 días antes. El embrión recibe el genotipo de la vaca donante y del toro, y la función de la receptora es únicamente la de incubar el embrión y alimentarlo hasta el parto. Todas las operaciones que se efectúan en el aparato reproductor de donantes (inseminación y colecta de embriones) y en receptoras (transferencia), son por medios no-quirúrgicos de bajo costo, simples y sin riesgos para el futuro reproductivo de las vacas utilizadas (Albarracin, 1998).

Zapien (1990), expresa que, bajo condiciones prácticas, el término transferencia de embriones debe entenderse como un conjunto de técnicas que permiten producir, recuperar y transferir embriones. El grado de éxito, medido como gestaciones y/o crías producidas, depende de la perfección con que cada una de ellas se realice.

2.3.4 Por qué se realiza la transferencia de embriones?

Asprón (1992), señala en su artículo que, en condiciones normales cada vaca produce una sola cría al año, lo cual significa que cuando mucho producirá 6 a 8 becerros durante toda su vida. A través de la inseminación artificial se pueden obtener miles de crías de un solo toro; con la transferencia de embriones se han llegado a tener más de 100 crías de una misma vaca durante su vida productiva, lo cual facilita el mejoramiento genético, con el consecuente incremento de la producción de leche.

Henríquez *et al.* (1998), afirman que al lograr 4 ó 5 crías más por año de una vaca sobresaliente, el avance en el progreso genético se acelera, de modo que acortamos a uno el periodo de cinco años que tendrían que pasar para tener el mismo número de crías con las características genéticas deseadas.

Palomino (2000), manifiesta que, un programa de transferencia de embriones cumple el objetivo de mejorar rápidamente el rendimiento productivo, toda vez que permite transplantar embriones de padres de élite, de tal modo que se ofrece la oportunidad de cambiar en la primera generación (F1) completamente la base genética de las crías, lo que permitirá transformar rápidamente hatos de vacas escasamente productivas, en establecimientos de animales de gran rendimiento, por poseer características hereditarias de importancia económica.

En hatos ganaderos ya establecidos, donde cuentan con alto nivel de mejora genética derivada del extranjero, la transferencia de embriones hace posible producir un mayor número de crías de hembras de calidad excepcional en menos tiempo que la reproducción natural y generar en poco tiempo una ganadería próspera. Una vaca excepcionalmente gran productora de leche, generaría de 5 a 8 crías durante toda su vida reproductiva útil, este mismo animal, mediante la súper ovulación e implante embrionario, producirá 20 a más crías en apenas un año y decenas de descendientes durante toda su vida productiva (Albarracin, 1998).

2.3.5 Beneficios que ofrece la transferencia de embriones

Asprón (1992), enumera las ventajas que ofrece la transferencia de embriones de bovinos:

- a. Permite hacer una rigurosa selección por el lado materno logrando un progreso genético acelerado.
- b. Obtener partos gemelares y aumentar la cosecha de becerros, con la bipartición de embriones se pueden obtener crías del mismo sexo.
- c. Es una excelente ayuda para evaluar la capacidad fertilizadora de los sementales, así como para determinar si son portadores de algunos defectos hereditarios.
- d. A través de congelamiento de embriones y de la fertilización en el laboratorio se pueden tener crías de donadores que ya murieron.

De Bem *et al.* (1994), precisan algunas ventajas de la transferencia de embriones bovinos como:

- a. Expansión genética y mejoramiento genético acelerado.
- b. Aumenta la posibilidad y la presión de selección de las hembras.
- c. Conservación de las razas en peligro de extinción, por la crío preservación.
- d. Intercambios internacionales de germoplasma.
- e. Comercio de embriones sexados y congelados.

Forlino (2005), en su artículo “Transferencia Embrionaria en Bovinos”, manifiesta que, los beneficios de esta biotecnología son los siguientes:

- a. Incrementar rápidamente la producción de hembras genéticamente superiores. Rescate genético de animales accidentados o enfermos permanentes, de los

que pudieran obtenerse embriones deseados, antes de que mueran.
Posibilidad de testaje genético rápido.

- b. Control y prevención de enfermedades.
- c. Importación y exportación.
- d. Maximizar el uso de semen de alto valor genético.
- e. Ayudar a la aclimatación de ciertas razas a diferentes medio ambientes.
Planificar cruzamientos.

Balbín Razeto (2004), precisa que, las transferencias embrionarias pueden acelerar el progreso genético del rodeo hacia biotipos que produzcan leche o carne, con la calidad que el mercado demande, y adaptados a sistemas de producción rentables. Los beneficios más importantes se pueden resumir en: Amortización del capital vaca donante. Amortización y eficiencia en la utilización de semen de alto valor genético y económico (0.8 dosis de semen por ternero). Hembras de reemplazo provenientes del núcleo genético. Machos seleccionados para dadores de semen, mediante inseminación artificial se va a lograr el impacto genético y productivo sobre el rodeo general. Mejoramiento de la calidad de toros para reposición y venta; disponibilidad de hembras para la venta, que antes hubieran sido de reemplazo. Estos beneficios quedan resumidos en avance genético y mejoramiento del rodeo a largo plazo, mientras que se obtiene un retorno inmediato de la inversión mediante la venta de embriones, y rentabilidad de mediano plazo con la venta de reproductores.

2.3.6 Etapas de la transferencia de embriones

Asprón (1992), manifiesta que el procedimiento de la transferencia de embriones considerando las siguientes etapas:

- a. Selección de vacas donadoras y receptoras.
- b. Selección de sementales.
- c. Superovulación e inseminación de las donadoras
- d. Sincronización estral donadora-receptoras.
- e. Recolección, búsqueda y evaluación embrionaria.
- f. Microcirugía embrionaria.
- g. Congelación, refrigeración.
- h. Transferencia del embrión a la receptora.

De Bem *et al.* (1994), manifiestan que, la transferencia de embriones bovinos consiste en colocar el embrión en el útero de la receptora ya sea por acto quirúrgico o no. La técnica comienza haciendo una buena sujeción de la vaca receptora, luego una verificación de formación de cuerpo lúteo por palpación rectal, introducción delicada de la pistola conteniendo el embrión y finalmente la deposición del embrión lo más cerca posible de la unión del útero con el cuerno uterino.

Palomino (2000), puntualiza con precisión las etapas a seguir en el programa de la transferencia de embriones: planeamiento reproductivo, personal competente y capacitado, selección de donantes y receptoras, implementación de protocolos probados en la superovulación y sincronización, recolección de embriones de las donantes, tratamiento post recolección a las donantes, manipulación de los embriones (evaluación), transferencia embrionaria, conservación mediante refrigeración a 5°C o mediante congelación a -196°C, finalmente el diagnóstico de preñez de las receptoras.

Zapien (1990), indica en su publicación “Transferencia de Embriones - Uso e Impacto en la Ganadería de Leche”, que algunas de estas etapas son: Selección de donadoras, de receptoras, superovulación, inseminación artificial de donadoras, sincronización del estro entre donadora y sus receptoras, recuperación, búsqueda y evaluación de embriones, micro manipulación, conservación y finalmente la transferencia de los embriones.

2.3.7 De las vacas donadoras

Asprón (1992), manifiesta que, desde el punto de vista genético la donadora debe ser un animal sobresaliente en cuanto a producción de leche, evaluando esto tanto en base a su propia producción como la de sus hijos e hijas; no debe descuidarse el aspecto del fenotipo, ya que muchas veces es lo que da mayor valor comercial a las crías, además debe ser un animal con buenos antecedentes productivos y reproductivos, que presente ciclos estrales de duración normal, con buena fertilidad (cargándose con uno o dos servicios o en un máximo de dos empadres), sin defectos anatómicos en el aparato reproductor.

Así mismo agrega que, en el aspecto sanitario deberán estar libres de enfermedades, especialmente aquellas que afectan la función reproductiva; según la región, deberán estar sometidas a un estricto programa de vacunación y desparasitación para garantizar un buen estado de salud. Deberán estar en perfectas condiciones físicas, ni gordas ni flacas, para obtener los resultados esperados. Deben emplearse en este

programa toros probados, en producción y tipo, para garantizar la calidad de crías. Si se emplea un toro no probado, los becerros resultantes quizá tengan menos valor que todo lo que se invirtió para producirlos (Albarracin, 1998).

Henríquez *et al.* (1998), este autor y colaboradores resaltan que, cuando la vaca donante ya ha recibido las hormonas y ha entrado en calor, se procede a inseminarla artificialmente con semen de un toro también de muy buena calidad. La vaca es inseminada en 3 intervalos de 12 horas para dar oportunidad de que la mayoría de los óvulos sean fecundados, ya que no todos están disponibles al mismo tiempo.

Palomino (2000), sostiene que, las vacas donantes potenciales serán genéticamente superiores, estarán en buen estado de salud, se tomará en cuenta su historia reproductiva, se debe saber cuántas crías ha tenido, cuántas inseminaciones son necesarias para preñarlas, que estén ciclando normalmente, si ha tenido problemas en el parto, en el puerperio, que sean de buen instinto maternal, normal intervalo entre partos, etc. Considerar datos de producción de leche por año, etc. Será necesario pasar por un examen clínico general en el que se debe examinar el aparato respiratorio, digestivo, circulatorio, locomotor, etc.

Igualmente realizar una exploración obstétrica: para evaluar por tacto rectal, las condiciones del aparato reproductor en general, además de la coloración de las mucosas vaginal y cervical, así como el aspecto del moco cervical. Verificar que las vacunaciones estén actualizadas y se tendrá en cuenta las enfermedades de cada región donde se realice la transferencia de embriones teniendo cuidado de las siguientes enfermedades: Leucosis, los herpes virus de la rinotraqueitis infección bovina (IBR), la vulvovaginitis postular infecciosa (IPV), tuberculosis, leptospirosis, lengua azul; entre las más importantes (Albarracin, 1998).

Walenciak (2005), en su artículo “Superovulación y alimentación en bovinos”, sostiene que, la alimentación adecuada de la donante es fundamental si se van a producir embriones, antes de que tenga lugar la reproducción, debe haber una ración alimenticia efectiva; una donante “gorda es un problema tan grande como una donante flaca”. Recomienda, evaluar la salud de la donante por lo menos un mes antes de la superovulación. La provisión de minerales de libre elección también es una buena idea. Algunas zonas también podrán necesitar suplementación para contrarrestar las deficiencias de selenio y cobre.

Esta autora citando a Lockhart. (2001) refiere que las hembras donantes se separan del resto del rodeo 30 días antes del flushing para centrarse en niveles de energía y

suplementación especial de minerales, "cuando está todo listo para el flushing, es importante tener un alto nivel de nutrición"; luego que se realiza el flushing, se les otorga un tiempo de descanso de 45 - 60 días, en donde los niveles de energía disminuyen para asegurarse que la vaca no ingrese muy gorda al próximo ciclo de flushing. La vaca potencialmente donante, debe ser reproductivamente sana para producir los mejores resultados. Deberá además, tener un tracto reproductivo normal en palpación rectal y deberá tener una historia post parto normal, especialmente relacionada con la duración de 18 a 24 días del ciclo del estro.

Salvador (2006), indica que como donantes son válidas todas aquellas vacas adultas que no presentan ningún problema de tipo ginecológico. En última instancia se pueden incluir en la transferencia de embriones animales que poseen, como mínimo, las condiciones anatómicas fisiológicas requeridos, es decir; que deben presentar ciclos regulares y posibilitar la palpación rectal. La selección de las donantes depende de los objetivos del programa y de los requerimientos que deban cumplir desde el punto de vista biotecnológico y zootécnico; son animales aptos los que hayan parido de dos a tres veces, que hicieron celos regulares tras un puerperio normal y que presentan un buen estado general. Antes de inducir la superovulación se debe comprobar la identidad de la donante, o sea; la identificación de su grupo sanguíneo; se requiere la comprobación total de su parentesco mediante los grupos sanguíneos.

Salvador (2006), dice que para el manejo y preparación, recomienda; que se debe tener en cuenta conservar los animales donantes en su ambiente normal, desde la inducción de la superovulación hasta el lavado y recogida de los embriones evitándose situaciones extraordinarias que desencadenen estrés como caminatas o presentación a exposiciones y concursos. Los animales estresados no responden a los tratamientos hormonales para inducir la superovulación independientemente del producto o la dosis aplicada. La condición básica para la buena reacción de un animal a los tratamientos hormonales es un bienestar del mismo. Situaciones de manejo esporádicas como sujeción para la inyección o la inseminación artificial son inofensivas, cualquier práctica de manejo prolongada que estrese al animal se debe evitar tras la superovulación, puesto que interfiere en el desarrollo normal de los embriones.

Zapien (1990), recomienda que en la selección de donadoras se debe tomar en cuenta la superioridad genética, habilidad reproductiva y valor comercial; estos tres factores de selección, aun siendo determinantes, no son únicos; otro tipo de factores como

resistencia al calor, enfermedades, condiciones ambientales adversas, pueden ser también factores importantes; técnicamente cada vaca o vaquilla ciclando regularmente puede responder a la superovulación y ser usada para producir embriones. Sin embargo, indica que las respuestas de vaquillas y vacas viejas son bajas. La donadora ideal puede considerarse con una edad de 4 a 9 años, con aparato reproductivo normal y sano, ciclando normalmente, bien alimentada y con partos regulares.

2.3.8 De las vacas receptoras

Asprón (1992), manifiesta que, debemos seguir los mismos puntos que en las donadoras, pero se pueden emplear animales de cualquier raza o cruce (el cruzamiento aumenta la fertilidad), sin importar su producción, pero teniendo en cuenta que se trate de animales jóvenes, sanos, con buen desarrollo corporal, especialmente de la pelvis ya que muchas veces tendrán que parir becerros muy pesados, que estén en perfecto estado nutricional, que sean dóciles y fáciles de manejar y con una producción de leche suficiente para criar hasta el destete a su becerro.

De Luca *et al.* (2006), en su trabajo de investigación “Niveles Plasmáticos de Progesterona en Receptoras de Embriones Congelados, determinados por Elisa-Test”, realizado en Buenos Aires-Argentina, expresa que la transferencia de embriones bovinos (sean frescos o congelados), como biotecnología aplicada, reconoce varias etapas que se inician con la hembra dadora y finaliza con las receptoras. Durante los últimos años se investiga con mayor énfasis a la receptora y su influencia sobre el porcentaje de preñez, relacionándola con la raza, edad, estado sanitario, nivel nutricional y productivo.

Hafez (1996), sostiene que debe establecerse un perfil endocrinológico que asegure la potencial fertilidad de la receptora y el establecimiento satisfactorio de una preñez, por cuanto, luego de la transferencia, es decisivo un cuerpo lúteo funcional, que a su vez dependerá de las señales luteotróficas y antiluteolíticas del embrión. Aun cuando no está definida la concentración de progesterona necesaria para que un embrión sobreviva durante la tercera semana post-implante; pero sí se han demostrado fallas en la concepción cuando la concentración de Progesterona es inferior a 1 ng/ml de plasma sanguíneo. Numerosas publicaciones señalan que los mayores índices de preñez con transferencia de embriones se logran con concentraciones de progesterona que oscilan entre 2 y 5 ng/ml de plasma. El programa de

sincronización que se utilizó fue el que considera la doble aplicación de Cloprostenol 500 ug. (Análogo de la PGF-2 α), con un intervalo de 11 días; entre las 48 - 96 horas después de la última inyección, presentaron celo manifiesto un total de 146 vaquillonas (74.0%). El día de la transferencia las vaquillonas fueron sometidas a tacto rectal con la finalidad de evaluar:

- a. Presencia y tamaño de los folículos;
- b. Localización y calidad de cuerpo lúteo, para determinar la calidad del cuerpo lúteo se estableció la siguiente escala subjetiva:
 - Muy bueno: de 15 a 25 mm. de diámetro, con corona manifiesta.
 - Bueno: de 15 a 20 mm. de diámetro, sin corona manifiesta.
 - Regular: menos de 15 mm. de diámetro, sin corona, con un folículo en cualquiera de los ovarios.
 - Malo: cuerpo lúteo muy pequeño, acompañado de un folículo con un diámetro de 5 a 15 mm.

La selección de una hembra receptora se rige, en primera instancia, por la observación de un celo manifiesto entre las 48 y 96 horas posteriores a la sincronización; luego el diagnóstico de un cuerpo lúteo, clasificándolo en forma subjetiva, de acuerdo al tamaño, presencia de corona, elasticidad del tejido luteal, en sincronismo con el día del celo de referencia; cualquier alteración en estos parámetros es suficiente para eliminar la receptora del programa, lamentablemente ninguno de estos criterios permite abrir juicio sobre la secreción hormonal del cuerpo lúteo.

No existe relación entre la calidad subjetiva del cuerpo lúteo y los niveles de Progesterona (P4), por cuanto el 29.2% de receptoras con cuerpo lúteo de calidad 1, registraron concentración de P4 inferior a 1 ng/ml, y el 31.8% de receptoras con calidad 2 de cuerpo lúteo, también registraron concentración de P4 inferior a 1 ng/ml. El ritmo de secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo es importante por cuanto permite una sincronización entre el medio intrauterino y el desarrollo del embrión. Un aumento prematuro de dicho esteroide durante el metaestro iniciaría un asincronismo entre ambos, similar a la situación que ocurre después de la transferencia de un embrión a una receptora que presentara celo 2 a 3 días antes que la donante. Si bien no se conocen con exactitud los niveles mínimos

que aseguran la viabilidad embrionaria, pueden considerarse adecuadas concentraciones de progesterona entre los 2 y 5 ng/ml de plasma sanguíneo.

En este estudio los porcentajes de preñez fueron de 67,9% y 9,09% para aquellas receptoras con niveles de progesterona entre 1 y 5 ng/ml, y menos de 1 ng/ml respectivamente. Finalmente De Luca manifiesta que, existe bibliografía que considera que con una concentración de progesterona menor a 2 ng/ml, los porcentajes de preñez oscilan entre el 8.3 al 35.3%, situación que se presenta en un 21 a 24% de las receptoras, no estableciéndose preñez alguna con niveles inferiores a 1 ng/ml. Los niveles de progesterona definitivamente altos (mayores de 6.0 ng/ml) no presentan una correlación positiva con el establecimiento de la preñez.

Henríquez *et al.* (1998), recomiendan que, para seleccionar las vacas receptoras debe tomarse en cuenta que se trate de animales jóvenes, sanos y con un buen desarrollo corporal, además de tener antecedentes de varios partos normales, con lo cual valoramos su fertilidad. Así mismo, deberá de contar en su historial con buena habilidad materna con el fin que desarrolle bien a las crías para que estas muestren todo su potencial.

Palomino (2000), propone que, estas vacas deben ser sometidas a los exámenes sanitarios, clínicos, reproductivos, vacunas y estados de nutrición, tan igual como los exigidos para las donantes, además deben ser sometidas a una exploración ginecológica: para verificar el sistema reproductivo. De preferencia debe ser mestiza o cruzada, pero bien desarrollada físicamente, de costo más bajo y poseer rusticidad. En cuanto a la edad, recomienda trabajar con vacas entre tres y siete años, dando preferencia a vacas adultas que tengan un buen historial de preñez y parto, pueden utilizarse novillas púberes pero bien desarrolladas.

Thompson (2005), publica el artículo “Transferencia de Embriones: Biotecnología de Punta”, en el cual recomienda seleccionar como receptoras a las hembras que tengan buenas ubres, grandes pelvis y de buen carácter maternal. También es necesario que las receptoras tengan un buen plan nutricional, su dieta debe tener entre dos y tres libras de proteína total, dependiendo de los requerimientos de tamaño y lactancia; no se debe subestimar la nutrición adecuada de los animales que se encuentran en el programa de transferencia embrionaria. Este no es el momento para ahorrar en raciones, dice Thompson.

Salvador (2006), refiere que toda novilla adulta desde el punto de vista sexual y sin patologías reproductivas, así como toda vaca sana y sin trastornos ginecológicos

puede ser tomada como hembra receptora, la selección general, desde el punto de vista genético en las receptoras no tiene mucho sentido, aun cuando no se puede descartar del todo una influencia materna de la receptora sobre los embriones y su desarrollo, el objetivo de la exploración ginecológica es rechazar animales con anomalías por ejemplo: con órganos sexuales juveniles, hermafroditismo, ninfomanía y endometritis, entre otros; también debe explorarse según su estado higiénico y analizarse enfermedades infectocontagiosas como leucosis, brucelosis, tuberculosis, BHV1, y BVD, etc., antes de aceptarlas como receptoras. La selección definitiva de la receptora se lleva a cabo el mismo día de la implantación dependiendo de determinados datos y del resultado de la exploración ginecológica en ese momento (calidad de cuerpo lúteo y estado del útero).

Así mismo menciona que, la sincronización del celo de las receptoras se puede inducir o bien con progestágenos (espirales - PRID o implantes subcutáneos) o con PGF-2 α administrando a las receptoras de 20 a 21 días antes de la transferencia la primera inyección de esta (pre sincronización) y el día 9° antes de la transmisión embrionaria se les administra la 2^{da} dosis de PGF-2 α , junto con la donante (sincronización). Un método de sincronización alternativo al anteriormente descrito consiste en administrar la PGF-2 α a las receptoras, 12 horas antes de aplicársela a las donantes.

Finalmente manifiesta que, las vacas receptoras suelen presentar, por lo general, el celo inducido con PGF-2 α algo más tarde que las tratadas previamente con Hormona folículo estimulante (FSH), lo que ayuda aún más a ajustar la sincronización entre donante y receptora. El celo sincronizado, que será el día 6 - 7° antes de la transferencia de embriones, se puede administrar hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) a las receptoras para estimular la ovulación y estabilizar el ciclo. Lo importante es que las vacas muestren un celo patente en el momento adecuado, sincronizado con el de la donante y que el momento de la transferencia presente un cuerpo lúteo palpable bien estructurado.

Zapien (1990), expresa que, la receptora ideal es la vaquilla o vaca joven libre de enfermedades, ciclando regularmente. La raza no es factor de importancia y los animales cruzados muestran mayor fertilidad. La receptora debe tener buena alimentación y desarrollo corporal para producir un becerro acorde con el tamaño de la raza que se está implantando.

2.3.9 De la superovulación

Asprón (1992), indica que la superovulación es el término empleado al referirnos a la producción de más de un ovulo, que es lo que sucede normalmente; mediante la aplicación de hormonas que estimulan a los ovarios de la vaca, con la finalidad que al inseminarla produzca un número mayor de embriones. Para realizar la superovulación, se administra la hormona FSH, que hace que en ambos ovarios se desarrollen varios folículos, los cuales ovulan después que la vaca donadora sale en calor al aplicarle otra hormona como es la PGF-2 α , dos días después de haber empezado a inyectarle FSH la misma que se le aplica cada 12 horas por vía subcutánea durante 4 días.

Bó y Mapletoft (1999), manifiestan que experimentos y pruebas de campo realizados durante la década de los 90 llevaron a la conclusión general que los tratamientos súper estimulatorios comenzados durante los días 9 o 10 después de detectarse el celo resultan en una mejor respuesta superovulatoria que aquellos iniciados antes (días 2 a 6) o después (día 12 o 13). Debido a que durante el ciclo estral bovino hay 2 o 3 (a veces 4 en el cebú) ondas de desarrollo folicular y en la mayoría de las vacas lecheras la segunda onda folicular comienza, en promedio, entre los días 9 y 10 días. No obstante, hay una gran variación individual y la segunda onda puede comenzar más temprano (día 6) o más tarde (día 12). Estudios realizados durante los últimos 5 años han demostrado claramente que los tratamientos súperovulatorios deben iniciarse al comienzo de una onda de desarrollo folicular, antes de la selección del folículo dominante, para obtener la mejor respuesta posible. La respuesta superovulatoria es significativamente mayor cuando los tratamientos se inician el día antes o el día de comienzo de la onda folicular (ya sea de la primera o segunda onda) que los tratamientos iniciados 1 ó 2 días después.

De Bem *et al.* (1994), manifiestan que, la superovulación en la vaca donadora se realiza en la fase progestágena, de preferencia entre el día 8 y el 12 después del celo. Se utiliza con buenos resultados la FSH, la dosis varía entre 18 mg a 50 mg., extremos utilizados para vaquillonas Nellore y vacas holandesas respectivamente. Cuando el número de superpoblaciones en una misma donadora es de rutina, se las realiza en intervalos de 60 a 90 días, con éxito. En cuanto a la aplicación de la FSH indican que, se realiza a partir de los 8 a 12 días después del celo natural o inducido por 4 días consecutivos, pero al tercer día se aplica la prostaglandina, de tal modo que la donadora entra en celo 2 a 3 días después y se insemina artificialmente 2

veces con intervalos de 12 horas, la colección se realiza entre los 6 y 7 días de haberla inseminado.

Henríquez *et al.* (1998), sostienen que, la técnica de superovulación consiste en hacer un tratamiento con hormonas a vacas de muy buena calidad, a las cuales se les llama donadoras. Las hormonas que son aplicadas a estas vacas hacen que produzcan un número de óvulos mucho mayor al normal, a este tratamiento se le llama “Superovulación”. Cuando la vaca donadora ya ha recibido las hormonas y ha entrado en calor, se procede a inseminarla artificialmente con semen de un toro también de muy buena calidad. La vaca es inseminada en 3 intervalos de 12 horas para dar oportunidad de que la mayoría de los óvulos sean fecundados, ya que no todos están disponibles al mismo tiempo.

Palomino (2000), escribe que, las hembras nacen con una gran reserva de folículos primarios que encierran los oocitos, a partir de la pubertad los folículos van a dejar el estado de reserva para comenzar a crecer de forma diferente, llegando algunos a su culminación y la mayor parte degenerando. En el transcurso de los ciclos estrales siempre hay folículos creciendo y degenerando, la producción de oocitos es muy limitada, se produce un solo ovocito en cada ciclo del estro, y por tanto, sólo se aprovecha un mínimo potencial genético en la producción de crías; el éxito de los programas de transferencia de embriones depende en gran medida en recuperar parte de este excedente de células germinales mediante las técnicas de crecimiento y maduración folicular múltiple y superovulación.

La hormona FSH tiene una vida media de dos a cinco horas en el torrente sanguíneo por ello se utiliza aproximadamente ocho dosis del preparado por vaca donante con un intervalo de 12 horas entre dosis, empezando entre el día 9 al 12 del ciclo del estro; de esa manera se mantienen los niveles sanguíneos adecuados para estimular constantemente el desarrollo folicular. Este tratamiento con FSH se administra en combinación con PGF-2 α para asegurar un intervalo predecible entre la terminación del efecto de la gonadotropina y la presentación del estro, el mismo que se presenta entre los dos a cuatro días por el efecto luteolítico de esta hormona sobre el cuerpo lúteo del ciclo, algunos investigadores recomiendan inducir la ovulación utilizando el producto comercial liberador de gonadotropinas o GnRH, al comienzo del estro para que las ovulaciones sean al mismo tiempo (Palomino, 2000).

El mismo autor indica que es posible conseguir más ovulaciones y coleccionar más embriones de mejor calidad y conseguir más preñeces tras un tratamiento de súper

ovulación con FSH empezando el día 10 y finalizando el día 14 del ciclo donde se usa un total de 30 a 50 mg, de hormona, dividida en ocho a diez inyecciones colocadas en forma descendentes y cada doce horas (a.m. y p.m.) Por vía muscular o sub cutánea, 72 horas después de la primera dosis de FSH se aplica PGF-2 α (25 a 30 mg.) en un solo día y repartida en dos dosis (a.m. y p.m.), vía sub mucosa vaginal para ambas hormonas.

Tratamientos superovulatorios repetidos.- Se ha llegado a un consenso general que los tratamientos súper ovulatorios repetidos en una misma vaca, pueden llevarse a cabo a intervalos de 4 a 6 semanas. Hay resultados contradictorios sobre la estimulación superovulatoria en un mismo animal donante en más de tres ocasiones; se piensa en los problemas de producción de anticuerpos contra las gonadotropinas elaboradas de otras especies, sobre todo en las de tipo PMSG. Por otro lado, se ha demostrado que la producción de anticuerpos contra PMSG no posee en forma repetida algún efecto en bovinos (Palomino 2000).

Donantes después de la superovulación.- Para que una donante sea aprovechada al máximo en el futuro, se necesita saber cuál será su comportamiento reproductivo después de la estimulación hormonal de la superovulación, generalmente se retrasa el estro subsiguiente, probablemente debido a la alteración endocrina forzada que sufre el ovario. Por ese motivo es necesaria la aplicación de 60 mg de PGF-2 α , luego de la recolección de los embriones y de esa manera ordenar rápidamente el equilibrio hormonal del ovario, produciéndose la luteólisis de todos los cuerpos amarillos, retornando al celo después de 12 a 16 días (Palomino 2000).

Levi (2006), precisa que para la superovulación normalmente se emplean hormonas folículos estimulantes, administrándose y dosificándose en forma decreciente durante cuatro o cinco días consecutivos, con intervalos de 12 horas. El fundamento del tratamiento superovulatorio es estimular el crecimiento de varios folículos ováricos entre los 8 y 14 días del ciclo estral; o la utilización de progestágenos combinados con estrógenos, de manera de evitar la detección de celos previos, y sincronizar la onda de crecimiento folicular al inicio del tratamiento superovulatorio. En cada ciclo se desarrollan ondas de crecimiento folicular de un sin número de células germinales, las cuales serán estimuladas hormonalmente por acción del tratamiento; en caso contrario, uno o dos folículos ovulan en condiciones fisiológicas; esto es la clave de todo tratamiento superovulatorio, y lo que explicaría el por qué aproximadamente el 30% de las vacas no responden al tratamiento.

Luna (2006), sostiene que, la superovulación consiste en la estimulación hormonal de la donante para la formación y desarrollo de varios folículos y su ovulación en ambos ovarios en un momento previamente fijado. La inducción de la superovulación sucede en el diestro entre el día 8 y 14 del ciclo con la inyección de hormonas gonadotropinas como la FSH, PMSG o HCG. El celo superovulatorio se provoca finalmente con PGF-2 α , la superovulación se puede inducir mediante la aplicación de una serie continuada de dosis decrecientes o iguales de FSH; la recogida de embriones presenta un resultado algo superior en el caso de series decrecientes, pero para “equipos” de transferencia embrionaria no muy experimentados la aplicación de dosis diferentes es algo más engorrosa y la probabilidad de cometer un error en la dosificación es mayor. El ciclo estral de la vaca tiene una duración media de 21 días (17 hasta 24) y el celo de 24 horas. Las novillas están en celo de 12 a 24 horas. El comportamiento de celo durante el estro superovulatorio se ve más acentuado en todas sus facetas respecto al del celo natural; sin embargo, no siempre se muestra en el momento esperado o, a veces no aparece, lo que desencadena diferentes consecuencias para la transferencia.

Tabla 1. Protocolo de superovulación con FSH

Pre sincronización (si es necesario)		
El 1 de abril, dos aplicaciones de PGF-2 α mañana y tarde.		
Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG		
Vacas con celos entre el 1 y 7 de abril son válidas para el programa		
15/04	mañana y tarde	Folltropin® 3ml
16/04	mañana y tarde	Folltropin® 2.5ml
17/04	mañana y tarde	Folltropin® 2.5ml
18/04	mañana y tarde	Folltropin® 2.0ml y PGF-2 α
19/04	mañana	exploración rectal
20/04	mañana	inseminación
	tarde	inseminación y HCG
21/04	medio día	inseminación
27/04	mañana o tarde	Recogida de embriones y Transferencia
vacas receptoras (aproximadamente 5 por donante)		
06/04	Primera dosis de PGF-2 α *	
17/04	Tarde, o el 18/04 en la mañana 2da dosis de PGF-2 α	
*receptoras que entren en celo del 30/03 al 11/04 no necesitan dosis de PGF-2 α .		

Fuente: Palomino, 2000.

2.3.10 De la inseminación artificial

Asprón (1992), manifiesta que normalmente en estos programas se emplea la inseminación artificial de la donadora, haciendo un servicio a las 12 horas y otro a las 23 horas de detectado el celo; esta inseminación se debe a que el periodo de ovulación puede llegar a ser de hasta 24 horas en las donadoras superovuladas.

Henríquez *et al.* (1998), afirman que, cuando la vaca donante ya ha recibido las hormonas y ha entrado en calor, se procede a inseminarla artificialmente con semen de un toro también de muy buena calidad. La vaca es inseminada en 3 intervalos de 12 horas para dar oportunidad a que la mayoría de los óvulos sean fecundados, ya que todos no están disponibles al mismo tiempo.

Palomino (2000), relata que, el estro de las vacas donantes después de haber finalizado el tratamiento de superovulación se produce entre los dos a cuatro días, sin embargo estudios realizados al respecto dicen que un 10% o más de estas vacas no presentan celo, porcentaje que alcanza a cualquiera de los estimulantes empleados para este fin. El tiempo mínimo que los espermatozoides han de estar en contacto con el tracto genital femenino para su capacitación -en los bovinos- es del orden de seis horas, por ello es aconsejable servir con más frecuencia, a intervalo de 12 horas inmediatamente y durante el celo, tratando de no manipular en exceso el tracto genital.

La utilización de semen mediocre o de pobre calidad, a menudo resulta en una recolección de oocitos sin fecundar o de embriones degenerados, la persona que insemina debe ser muy cuidadosa y muy profesional ya que en la doble inseminación se puede introducir una infección al tracto reproductivo de la vaca. Se ha constatado, que la primera ovulación ocurre 59 horas después de la aplicación de PGF-2 α , de allí que se concluye; que la primera inseminación en vacas superovuladas deberá ser realizada luego de los primeros signos del celo, y la segunda inseminación 12 horas después y excepcionalmente una tercera en caso el celo se prolongue por más de 24 horas.

Levi (2006), precisa que la inseminación artificial se realiza entre las 12 y 24 horas posteriores al celo de superovulación; vale decir, a los seis días de iniciado el tratamiento superovulatorio, deberán tenerse en cuenta los horarios de inseminación, calidad y manejo del semen congelado, asepsia e higiene de las operaciones.

Acuña (2006), advierte que debido a que las ovulaciones tienen lugar en momentos diferentes en un intervalo de tiempo amplio es necesario inseminar tres veces consecutivas cada 12 horas. Si la superovulación se ha inducido con FSH es conveniente aplicar en el momento de la 2^{da} inseminación de 3,000 a 5,000 UI de HCG para reducir algo el intervalo de tiempo en el que se suceden las ovulaciones. La inseminación artificial se debe realizar con especial atención puesto que la inseminación repetida del animal aumenta el riesgo de contaminación por gérmenes, lo que disminuiría o anularía totalmente el éxito de la transferencia, además se debe evitar la exploración de los ovarios y de los folículos durante la misma por que conducen fácilmente a la ruptura de los folículos preovulatorios; los ovocitos procedentes de ovulaciones así provocadas son inmaduros, es posible tener éxito con tan solo dos inseminaciones si se programan dependiendo del comportamiento del animal donante (del comienzo del celo y de su duración), debiéndose llevar a cabo la primera inseminación de 8 a 10 horas tras el comienzo del celo y 10 a 14 horas después la segunda; en el caso de inseminaciones con más de un toro se debe aclarar de antemano si las características de los grupos sanguíneos de los mismos permitirá la diferenciación genética de la descendencia.

Zapien (1990), refiere que, existen diversos tratamientos hormonales, la mayoría de ellos se inician entre los días 8 al 14 del ciclo estral, contando el día del celo como 0. Una vez terminado el tratamiento superovulatorio y a 12 horas de presentado el estro, se aplican dos o tres inseminaciones a intervalos de 12 horas. Este número de inseminaciones son necesarias debido a que en la vaca superovulada la liberación de óvulos no ocurre simultáneamente sino en un periodo de 24 a 48 horas.

2.3.11 Sincronización entre la donadora y la receptora

Asprón (1992), recomienda que, para sincronizar los estros entre la donadora y la receptora se pueden utilizar sincronizadores de estro, inyectando prostaglandinas, dos veces con intervalos de 11 días, de tal forma que la segunda aplicación se realice un día después de haber empezado a superovular a la donadora, también se pueden emplear sincronizadores en forma de implantes, que se colocan subcutáneamente en la oreja de cada receptora 7 días antes de iniciar la superovulación y se retiran dos días después de haberla colocado.

Con cualquiera de estos métodos, las receptoras deben estar en celo al mismo tiempo que la donadora o cuando mucho un día después de ella; si manifiestan el estro en cualquier otro día no será posible utilizarlas para la transferencia. Presenta además,

un protocolo de sincronización entre la vaca donadora y sus receptoras, el mismo que es sugerido según el manual of the International Embryo Transfer Society (IETS), para su aplicación en un programa de transferencia de embriones.

Becaluba (2007), refiere que además de la administración de gonadotropinas sintéticas, la donante recibe una dosis luteolítica de PGF-2 α a las 48 horas de comenzado el tratamiento superovulatorio, con lo que a las 36 a 48 horas presenta signos de celo. En caso de transferirse embriones frescos (sin congelar) las receptoras deberán ser tratadas con PGF-2 α 18 a 24 horas antes que las donantes, de manera que el estro se presente en forma sincrónica entre las donantes y las receptoras. Es aconsejable detectar el celo en las receptoras desde las 12 a 24 horas después de la administración de PGF-2 α y a las donantes desde las 36 horas post aplicación de PGF-2 α ; normalmente las vacas donantes entraran en celo entre 36 a 48 horas post aplicación de estas prostaglandinas, pero si no hay signo de celo se realizarán las inseminaciones artificiales a las 60 y 72 h post aplicación de prostaglandina.

Tabla 2. Protocolo de sincronización de la vaca donadora y sus receptoras

DONADORA		RECEPTORAS	
Día	Evento	Día	Evento
-3	Cloprostenol, (Estrumate®) 3ml. E.V.		
-2			
-1			
0		0	
1	Celo: Evaluación de Secreciones	1	
2		2	
3		3	
4		4	Implante y aplicación
5		5	Crestar 2ml
6		6	
7		7	
8		8	
9		9	
10		10	Cloprostenol,
11		11	(Estrumate®) 3ml.
12		12	
13		13	Retiro del Implante
.		.	
.		.	Celo: Evaluación de
.		.	Secreciones
20	20	Transferencia de	
		Embriones.	

NOTA: La aplicación de FSH se puede realizar a las 6:00am y 6:00pm y la PGF-2 α a las 12:00 del día

Fuente: International Embryo Transfer Association (IETA).

Las vacas que entran en celo un día más tarde deben ser re inseminadas pero van a dar respuesta pobre (1 o 2 cuerpos lúteos), por el contrario, las que expresen celo en

el momento esperado o un poco antes van a tener una respuesta aceptable. Por lo general cuando los signos de celo se presentan antes de lo previsto (no más de 24 hrs), las inyecciones se pueden suspender y se realiza la inseminación a las 12 a 24 horas de iniciado el estro. Hay divergencia en cuanto al número de inseminaciones necesarias, muchos profesionales realizan dos, a las 12 y 24 horas de iniciado el estro y otros utilizan tres, a las 0, 12 y 24 horas de iniciado el estro. A continuación muestra un esquema tradicional de superovulación en bovinos, el cual recomienda utilizar en la ejecución de algún programa de transferencia de embriones (Hafez, 1996).

Tabla 3. Esquema de superovulación en bovinos

Día	Donante	Receptoras
0	Detección de celo	
10	Tratamiento con gonadotrofinas	
11	Tratamiento con gonadotrofinas	PGF-2 α (medio día)
12	Tratamiento con gonadotrofinas + PGF-2 α	
13	Tratamiento con gonadotrofinas	
14	a.m. Detección de celos - p.m. 1ra. I.A.	a.m. Detección de celos
15	a.m. 2da. I.A.	
21	Recolección de embriones	Transferencia de embriones.

Fuente: International Embryo Transfer Association (IETA).

Palomino (2000), propone la sincronización mediante la combinación de tratamientos hormonales como por ejemplo el Crestar®, que es el método del implante y que consta de dos partes: norgestomet y valerato de estradiol. Luego describe su uso:

Colocar un implante hidrón cilíndrico sólido de 3 x 18 mm contenido en una presentación de polipropileno, bajo la piel de la superficie externa de la oreja, para evitar el desplazamiento a causa de los frotos, el cual contiene 6 mg. de progestágeno sintético extremadamente potente (norgestomet) y 5 mg. de un estrógeno de alta eficacia (valerato de estradiol), el implante y la inyección se administra el primer día de tratamiento. El retiro del implante 9 días más tarde produce una respuesta estral satisfactoria luego de 2 a 4 días y una fertilidad normal.

Los 6 mg. de norgestomet, suministrará una dosis continua suficiente para inhibir la actividad de la FSH y LH, por ende la ovulación durante los 9 días que la vaca tiene el implante, el segundo componente que es la inyección y que contiene 6 mg de norgestomet y 5 mg de valerato de estradiol, causan en el flujo sanguíneo, un

aumento rápido del nivel de norgestomet, el cual inhibe el desarrollo folicular, el valerato de estradiol, a pesar de ser un agente luteolítico activo, no obstruirá efectivamente la formación de un nuevo cuerpo lúteo, después de ocurrida una ovulación, sin embargo interactuará bien con el norgestomet para inhibir la formación o inducir la regresión del cuerpo lúteo recién formado.

Además resalta que, al momento de remover el implante de la oreja, ocurre una marcada y estrepitosa caída en los niveles sanguíneos del norgestomet, muy similar a la caída de los niveles de progesterona en la sangre que se observa con la luteólisis del cuerpo lúteo, por ello hay un desarrollo folicular rápido, ocurriendo el estro y la ovulación subsiguiente. Es el momento de revisar las vacas receptoras vía palpación rectal con la finalidad de verificar que el flujo vaginal esté limpio, de tal modo que a los 7 días post celo se realice el implante de los embriones en fresco o congelados; el 85 al 90 % de las vacas tratadas, muestran signos externos de celo a las 24 a 36 horas después del retiro del implante. Lo que se hace con el tratamiento Crestar es inducir un reposo o periodo de descanso en el ciclo reproductivo de la vaca, los niveles altos de norgestomet que se introducen en la vaca, tanto por medio del implante como por la inyección, aparentan un “cuerpo lúteo artificial”.

Enfatiza también que, por sus componentes, este tratamiento está diseñado para ser efectivo durante todas las etapas del ciclo estral, de tal modo, que cuando se piensa tratar un grupo de animales para receptoras de embriones, todas las etapas del ciclo estarán presentes: algunas estarán en estro (estro = día “0” del ciclo), algunas apenas habrán ovulado (1 - 4 días del ciclo), algunas tendrán un cuerpo lúteo funcional (6 - 16 día del ciclo), mientras que en otras el cuerpo lúteo se encontrará en estado de regresión (17 a 20 día del ciclo).

Sincronización para embriones congelados.- Para llevar a cabo el trasplante embrionario a la práctica diaria de campo, se maneja la sincronización exacta (sincronía “0”) entre la edad del embrión por trasplantar y la receptora que lo recibirá, mediante el deshielo de los embriones congelados cuando las hembras receptoras alcancen el día del ciclo sexual más apropiado después del celo sin fecundación, es decir, que puede darse la sincronización de las vacas receptoras sin que sea necesario emplear la vaca donante. Los embriones se congelan, se almacenan y se trasplantan cuando se encuentran receptoras adecuadas disponibles. Esto quiere decir, que se convierte en una suerte de embriones a la espera que una receptora llegue al momento adecuado y no al revés.

Acuña (2006), publica que, es indispensable confeccionar previamente un plan de sincronización, según el cual las hembras serán sincronizadas con una variación de +/- 3 días y los celos de las donantes disponibles deben presentarse con una diferencia temporal de menos de 7 días entre ellos. La sincronización previa de 4 a 5 vacas donantes para un programa de transferencia embrionaria es lo ideal porque, por un lado, se tiene la seguridad de no salir con las vacas vacías aunque falle una u otra y, por el otro, el lavado de 5 animales con las transferencias y/o la crío conservación de los embriones obtenidos es factible a lo largo de un día. La sincronización se puede iniciar pronto, 4 semanas post parto, en caso de vacas, y que no presenten ninguna anormalidad de tipo ginecológico que las haga rechazables como donantes. Es aconsejable administrar HCG o GnRH durante el celo para inducir la ovulación y estabilizar el ciclo.

2.3.12 De la colección de los embriones

Asprón (1992), refiere que, la colección se realiza mediante un sencillo lavado de útero de la donadora, empleando para ello una solución salina a la que se le adiciona suero sanguíneo y antibióticos. Primeramente se aplica anestesia epidural para evitar las contracciones del recto y que permita la manipulación del útero durante la introducción del látex que se fija mediante el inflado de un globo que tiene cerca de la punta; con ayuda de mangueras de hule se introducen unos 100 - 200 ml de la solución al útero y por palpación se da masaje a los cuernos uterinos para desprender los embriones y extraer la solución hacia un filtro que retiene a los embriones, dejando pasar solo el líquido, el proceso se repite varias veces hasta agotar un litro de solución para tener la seguridad de que salieron todos los embriones, si el lavado se hizo de forma adecuada es poco probable que se quede algún embrión en el útero, pero para mayor seguridad se aplican prostaglandinas a la donadora para provocarle un calor y evitar que se quede cargada. Los embriones son microscópicos, por lo que es necesario localizarlos en el laboratorio con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Una vez terminado el lavado, el filtro se vacía en un recipiente de plástico y se enjuaga con solución a presión, el recipiente se revisa a 15x y al localizar cada embrión se va pasando con una pipeta a otro recipiente más pequeño que contiene la misma solución con más suero. Solo sirven para transferencia aquellos embriones que están en un estado de desarrollo de mórula o blástula, que es lo normal a los 7 días después de la fecundación, los óvulos que no fueron fecundados y los embriones de escaso desarrollo son desechados inmediatamente (Albarracín, 1998).

De Bem *et al.* (1994), describen que, la colección de embriones consiste en pasar artificialmente el líquido a través del útero con PBS (Phosphate Buffered Saline) a una temperatura de alrededor de 25°C y un pH de 7.2. La sonda de colección pasa por el cuello uterino y se fija en uno de los cuernos por un globo de aire, el líquido de lavado es introducido por gravedad en volúmenes de 50 a 150 ml, dependiendo del tamaño del útero, completando un volumen total de 500 a 1 000 ml, la recuperación del líquido también se efectúa por gravedad. Con la práctica en las colecciones, el operador puede elevar la tasa de colección teniendo en cuenta los siguientes detalles:

- a.- Sujeción adecuada de la donadora.
- b.- Leve anestesia epidural.
- c.- Buen uso del dilatador cervical, si hubiera dificultad en pasar la sonda.
- d.- Colocar e inflar bien el globo y regular la presión al tacto.
- e.- Masajear suavemente los cuernos uterinos.
- f.- Tranquilidad y seguridad.
- g.- Un buen auxiliar.

Henríquez *et al.* (1998), manifiestan que, los embriones que resultan de la inseminación artificial heredan de sus padres todas las características que los hacen superiores al resto de los animales del hato. Todos los embriones producidos son extraídos de la vaca donadora y son evaluados antes de ser transferidos a varias vacas de menor calidad, a las que se les llama receptoras, las cuales son animales que no tienen buena calidad genética, pero cuentan con las características necesarias para mantener la gestación de una cría, transfiriéndole los anticuerpos a través del calostro y la lactancia, protegiéndolo durante los primeros meses de vida.

Palomino (2000), sostiene que, los oocitos fecundados no alcanzan la cavidad del útero sino hasta los cuatro a seis días después del fenómeno de la ovulación y fecundación, por lo tanto, estarán situados en el oviducto si tienen menos de esos días de edad. Todo ello brinda una pauta cercana para realizar los lavados uterinos, es así que; forzando a fluir una solución al interior del útero, se logra suspender y arrastrar en el líquido especial, los embriones jóvenes que están aún sin implantarse. El operador debe tener una idea aproximada de cuantos embriones se habrán generado para la recuperación, verificando por tacto rectal, el número de cuerpos

lúteos existentes en los dos ovarios; si con ello se determina que la donante no respondió al tratamiento superovulatorio y que la recuperación de embriones será pobre (uno o dos solamente) o nula, entonces no vale la pena seguir adelante con la colección programada.

También afirma que, se usa la recolección por método no quirúrgico que consiste en hacer pasar sondas a través del conducto cervical hasta el útero con gran rapidez y eficiencia, hay que destacar los modelos de sondas embrio - captoras de materiales especiales, basados en el uso corriente en humanos, como la sonda para cateterismo uretral de Foley.

Este aparato irrigador es de dos vías; una llega al baloncito inflable que sirve para cerrar la cavidad caudal del cuerno uterino para que no se escape el líquido de lavado; la segunda vía permite dos acciones, la primera, que se introduzca el medio de colección irrigado por medio de dos agujeros localizados cerca de la punta del catéter y permite recuperar dicho medio con los embriones por los mismos agujeros.

Procedimiento.- El método comienza, colocando a la donante que ha estado privada de agua y alimento durante 24 horas, en un brete que deje la parte trasera de la vaca libre para una mejor manipulación, allí se coloca la anestesia epidural baja para prevenir el movimiento e inducir la relajación del tracto digestivo posterior y genital al momento de operar, seguidamente se procede a evacuar el recto para luego lavar prolijamente con agua y jabón la región perineal, secar y luego sujetar la cola para evitar contaminaciones. Si no se ha realizado antes, es el momento de contar el número de cuerpos lúteos de los ovarios por tacto rectal.

La sonda Foley se la hace rígida con un mandril de acero para introducirla vía vaginal a través de la cerviz y situarla dentro del cuerno uterino elegido; a veces será necesario dilatar el canal cervical en animales primerizos mediante un instrumento llamado precisamente dilatador de cerviz. Cuando ya el catéter Foley está situado en posición correcta, es decir que el baloncillo inflable o globo está por delante de la bifurcación de los cuernos, se llena éste de aire con unos 10 a 15 ml. en vaquillonas y de 18 a 22 ml. en vacas adultas para que no haya deslizamiento y evitar el escape del medio de colección.

Usando la modalidad de recolección del flujo por gravedad en circuito cerrado, el extremo libre del catéter ya ubicado en el útero, mediante la unión en forma de “Y” se conecta a las dos tuberías flexibles de un circuito que va a ser cerrado, la vía de entrada se conecta a un recipiente que contiene 1000 ml. del medio de colección a

37°C y colocado a un metro por arriba del nivel del útero de la donadora, la vía de salida es conectada mediante una tubería flexible a otro recipiente estéril de vidrio de 1000 ml para recibir el medio con los embriones.

Se procede a abrir el clamp para que ingrese al útero el medio de lavado por gravedad, se oprime suavemente la unión útero - tubárico por presión de los dedos índice y pulgar y con los otros dedos se da masajes para que los embriones salgan de los pliegues del cuerno, sifoneándose cantidades de 20 a 60 ml de medio, seguidamente se abre el clamp de la tubería de drenaje para que salga el medio con los embriones hacia el recipiente colector protegido de los rayos del sol, ubicado a nivel más bajo que el útero -puede ser a nivel del suelo- se repite la maniobra alternativa de lavado por varias veces hasta utilizar 500ml del medio, se pasa el catéter al otro cuerno uterino y se procede de la misma manera a lavar el cuerno uterino con el medio que queda (500 ml).

Una vez finalizado el lavado del útero, el medio recuperado con los embriones es llevado al laboratorio donde luego de un periodo de sedimentación de 30 minutos en una incubadora a 37°C ó a temperatura ambiente del laboratorio si éste es abrigado; los embriones por su peso sedimentan al fondo de los recipientes, luego se decanta quedando de 100 a 200 ml. del medio con los embriones, esta solución es vertida suavemente en dos o tres placas Petri de 80 ml. de capacidad con fondo plano y diseño cuadrículado para buscar a los embriones ordenadamente bajo el microscopio estereoscópico.

Jonathan *et al.* (2006), refieren que entre los 6 y 8 días posteriores a la inseminación, se procede a efectuar el lavado uterino. Las vacas donantes permanecerán en ayuno de sólidos y líquidos las 24 horas anteriores a la recuperación, para facilitar la palpación rectal y el manipuleo del instrumental. Una vez efectuado el lavado, se procede a la búsqueda, aislamiento y cultivo *in vitro* de los embriones que son aptos para su posterior implante.

Jhanett (2006), manifiesta que la recogida de embriones se realiza, preferentemente el 7° día después de la primera inseminación mediante un lavado uterino trans cervical, es el día más conveniente para realizar el lavado, puesto que es cuando los embriones son más fáciles de extraer y separar; en ese momento se ubican en el extremo anterior del cuerno uterino y mediante el lavado son fácilmente arrastrados al exterior flotando en el medio de colección, además en ese momento los embriones se encuentran en el estadio de blastocisto o de mórula, fases muy estables, lo que

hace posible que sean transferidos directamente o que sufran otras manipulaciones como la congelación y la micro manipulación. Una exploración rectal de los ovarios orienta sobre el posible número de embriones que se podrían recoger, según el número de cuerpos lúteos que se puedan palpar.

La recogida no quirúrgica o lavado de los embriones se realiza a través de la vagina, bajo control rectal y con el animal sujetado eficientemente; tiene una duración de 15 a 20 minutos por animal y es sencillo y efectivo. Para el lavado se utiliza un catéter o sonda flexible con balón hinchable modelo: Neustadt / Aisch. Lampeter o Dissi, que se introduce con un mandril o fiador, para hacerla rígida, a través de la vagina, cerviz y cuerpo uterino hasta uno de los cuernos, cuando el extremo de la sonda se halla en la curvatura mayor del cuerno uterino se retira el mandril de 8 a 10 cm. y se sigue avanzando con cuidado la sonda flexible en dirección craneal. A continuación se infla el balón que se encuentra inmediatamente detrás del extremo del catéter (Hafez, 1996).

Se controla el grosor y situación del balón y se retira el fiador totalmente, la situación del catéter es correcta cuando el balón, según los diferentes tamaños de los úteros, se encuentra aproximadamente 5cm. craneal a la bifurcación uterina, a la altura, aproximadamente, del ligamento Inter cornial.

La recogida de los embriones se lleva a cabo por medio de un lavado con una solución templada en fracciones de 30 a 50 ml que fluyen de nuevo al matraz de recogida previamente tratado con silicona, tras retirar la jeringuilla de la sonda; es conveniente mover y masajear ligeramente el cuerno uterino, así los embriones localizados en criptas o pliegues son arrastrados por la corriente del medio de colección hacia el exterior; al finalizar el lavado de uno de los cuernos uterinos se debe infundir de nuevo de 20 a 50 ml de medio levantándose el extremo craneal del cuerno para posibilitar el reflujo del último resto de líquido infundido ahí acumulado. El medio resultante de la recogida se mantiene a temperatura ambiente hasta el aislamiento de los embriones, evitando oscilaciones de temperatura.

2.3.13 De la valoración y clasificación de los embriones

Asprón (1992), expresa que, los embriones transferibles son muy parecidos entre sí, pero pueden tener cierta diferencia en su desarrollo y en sus características morfológicas. En base a ello se les clasifica de la siguiente manera:

Calidad 1: Excelente, sin ningún defecto.

Calidad 2: Bueno, con defectos leves.

Calidad 3: Regular, con defectos mayores, pero apto para transferirlo.

Refiere finalmente que, los embriones de estas tres calidades pueden ser transferidos en fresco (inmediatamente) o refrigerados (a 4°C hasta por 24 a 48 horas), pero sólo los de calidad 1 y 2 pueden ser congelados, ya que los de calidad 3 no resisten la congelación.

Palomino (2000), manifiesta que todo material que entra en contacto con el medio que contiene los embriones, será previamente lavado con agua y detergente biodegradable, por ejemplo con: Alconox; enjuagado con agua des ionizada, esterilizado y en correctas envolturas. La maniobra de buscar los embriones en recipientes transparentes, fáciles de cerrar, inertes, cómodos y de pequeño volumen; como las placas de Petri, se realiza bajo el microscopio estereoscópico con un aumento de 20 a 30 veces, es necesario examinar cada placa dos veces por una misma persona.

Los embriones son aspirados en la micro pipeta con un mínimo de volumen del medio 0.2 ml, en estas condiciones son evaluados rápidamente para su implante inmediato “en fresco” o crío preservarlos para su uso posterior, si se requiere el almacenamiento de los embriones por más de cuatro horas antes de ser implantados es necesario cambiarlos de medio fresco cada dos a tres horas, conservándolos en envases de pírex o plástico transparente, de cierre fácil y pequeños.

Además resalta que se consideran buenos embriones a aquellos que se presentan esféricos y de células compactas, la mayoría de los blastómeros son del mismo tamaño, con algunas de estas células sueltas, con tonalidades muy claras y uniformes de un suave tinte marrón, el citoplasma de estas células es muy poco granulado y de distribución uniforme con pequeñas vacuolas, su espacio peri vitelino es vacío y de regular diámetro, la zona pellúcida se mantiene simétrica sin pliegues, hay poco detritus celular. Por el contrario y en líneas generales, no debemos considerar a los

embriones viables si presentan la mayor parte de blastómeros de dimensiones variables, zona pellúcida deforme o colapsada, deformaciones en la figura de mitosis, blastómeras muy pálidas que no se pueden distinguir la forma, de color oscuro, citoplasma fragmentado con mucho detritus, mórula y cavidad blastocística deformada. Muestra a continuación, la clasificación de embriones bovinos:

- a. Excelente: Embriones perfectos para su etapa, blastómeras de tamaño similar, color y textura homogéneos (no muy claros ni muy oscuros), el citoplasma no es granular o de distribución desigual, contiene algunas vesículas de tamaño moderado, el espacio peri vitelino está vacío y de diámetro regular, la zona pellúcida intacta, no está arrugada ni colapsada.
- b. Buena: Imperfecciones ligeras como una forma oval, unas pocas y pequeñas blastómeras excluidas, tamaño pequeño y degeneraciones reducidas al mínimo.
- c. Regular: Problemas definidos pero no graves, como número moderado de blastómeras excluidas, tamaño pequeño y degeneraciones excluidas al mínimo.
- d. Pobre: Degeneración parcial, células vesiculadas, gran variación en el tamaño celular, muy pequeñas etc.
- e. Muy pobre: Degeneración severa, no válido para el implante, dos o tres células, detritus, contaminación microbiana.

Alberti (2006), sostiene que bajo la lupa estereoscópica y con haz de luz difusa, entre 10x y 60x, se examina el estado morfológico de los embriones y se clasifican según su calidad. Los embriones en perfecto estado desde el punto de vista morfológico se pasan a una placa de Petri pequeña con medio de cultivo recién filtrado y así se lavan 10 veces (para diluir posibles gérmenes), conservándose a temperatura ambiente hasta su transferencia o próxima manipulación. Cada paso de lavado debe realizarse en una dilución de 10:1 de medio de cultivo y el traspaso de los embriones de una placa a otra se debe realizar cada vez con micro pipetas estériles (Unopetten). Sólo se deben transferir aquellos embriones que se encuentran en un estadio de desarrollo correspondiente a su edad y de los que, basándose en sus características morfológicas, cabe esperar continúen su crecimiento. Los Ovocitos así como embriones totalmente degenerados, se deben rechazar inmediatamente. Los embriones / ovocitos recolectados por lavado el día 7, se clasificarán según su edad y

estadío de desarrollo de la siguiente manera: Mórula temprana compacta, blastocito inicial, ovocito no fecundado y embrión total o mayoritariamente degenerado.

Tabla 4. Descripción cualitativa y clasificación de los embriones.

Clases	Descripciones
Clase 1	Calidad excelente. Embrión esférico, Zona pellúcida intacta, cúmulo celular perfectamente estructurado con células del mismo tamaño color y textura
Clase 2	Calidad buena. Embrión esférico o ligeramente elipsoidal, Zona pellúcida intacta, algún blastómero suelto pero, por lo demás, cúmulo celular perfecto.
Clase 3	Calidad regular. Zona pellúcida intacta o dañada, blastómeros de diferentes tamaños, cúmulo celular con un 30 hasta un 60% de blastómeros intactos, ligero retraso del desarrollo (estadío de 32 células)
Clase 4	Calidad mala. Zona pellúcida intacta o dañada, blastómeros degenerados y sueltos en número considerable, cúmulo celular suelto y con menos del 30% de blastómeros intactos, desarrollo retardado con estadíos embrionarios de blastómeros grandes (32,16 células).
Clase 5	Embrión degenerado. Zona pellúcida, normalmente intacta, cúmulo celular con aspecto desorganizado y suelto, blastómeros de diferentes tamaños y pignóticos en muchos casos, estadíos de desarrollo ya paralizado (2,4,8 hasta 16 células)
Clase 6	Ovocito no dividido. Ovocito fertilizado o no, pero no dividido, rodeado de una Zona pellúcida intacta o no, perfectamente esférica.

Fuente: International Embryo Transfer Association (IETA).

2.3.14 Del diagnóstico de gestación

Aller *et al.* (2000), mencionan que este grupo de Biotecnología de la Reproducción Animal, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce, Argentina, en su trabajo de investigación "Gestación con Embriones producidos in vitro a partir de Ovocitos Recuperados de Vacas Ovariectomizadas" realizaron el diagnóstico de preñez por palpación rectal 55 días después del trasplante de los embriones.

Jonathan (2006), manifiesta que el diagnóstico de gestación se realiza a los 60 días de implantado el embrión, por medio de la palpación rectal, o bien por ecografía entre los 27 y 32 días después de la inseminación artificial o monta natural.

De Luca *et al.* (2006), en su trabajo de investigación "Niveles plasmáticos de progesterona en receptoras de embriones congelados determinados por Elisa-Test" realizado en Buenos Aires-Argentina, trabajaron con vaquillonas Holando Argentino, de condición corporal 3 puntos en la escala americana, obtuvieron de un total de 111 receptoras seleccionadas y transferidas, 56 de ellas, es decir; el 50.45% presentaron preñez positiva al tacto rectal. Los embriones que utilizaron para la

transferencia fueron clasificados, como: calidad 1 o Excelente y calidad 2 o Buena, no encontraron diferencia significativa ($P < 0,05$) en el uso de estas dos calidades respecto al porcentaje de preñez. Los resultados que obtuvieron, fueron contrastados con otras publicaciones, coincidiendo en que los mejores índices de preñez se logran en aquellas receptoras que presenten niveles de progesterona plasmática entre 1 y 5 ng/ml. La preñez fue diagnosticada por tacto rectal entre los días 45 y 60 posteriores a la transferencia.

De Sandro (2005), realizó un trabajo sobre la “Tasa de gestación en hembras bovino después de la transferencia de embriones frescos y embriones congelados producidos *in vivo*”, utilizó vacas de score corporal de 3 a 3.5 de un total de 5 puntos, la superovulación se realizó entre el día 9 y 11 del ciclo del estro; se trató a cada donante con las dosis de FSH porcino que disminuían durante 5 días, combinadas con prostaglandina F2 alfa, inseminaron artificialmente 2 y 3 veces; los embriones transferibles, recuperados 7 días después fueron implantados en receptoras sincronizadas, la mitad de los embriones eran congelados y sucesivamente implantados en vacas 7 días después del celo inducido.

En este ensayo llevado a cabo en España en el periodo 2003/2005, con embriones transferibles y sin congelar, la tasa de gestación fue de 55% (463/842), se implantaron un total de 322 embriones congelados, lográndose una tasa de gestación del 49% sin diferencia significativa ($P < 0,05$) con lo obtenido usando embriones frescos. Precisa que los resultados totales, obtenidos en los diversos ensayos indicaron que la transferencia de embriones, sean frescos o congelados es una técnica conveniente que puede mejorar el valor económico del grupo de estudio.

Duterte (2008), expresa que, en su país existen 4 millones de vacas, de las cuales el 70% son de la raza Holstein y Normando y el 30% Monthbelier y otras, manifiesta además que de 2,000 vacas donadoras obtienen 11,000 embriones o sea, 5.5 embriones transferibles por colección, y que de 3 millones de transferencias realizadas anualmente resultan 1.5 millones de vacas preñadas y en la actualidad el nivel de efectividad en Francia es del 50%.

2.3.15 De la conservación de los embriones

Asprón (1992), precisa que la refrigeración permite tener viables los embriones hasta por 24 a 48 horas, colocándolos dentro de recipientes en un refrigerador casero o de laboratorio, a una temperatura de 4° C. Para la congelación se requiere añadir 10% de Glicerol a la solución salina para que proteja el embrión durante el proceso de

congelación. El embrión se coloca en una pajilla previamente identificada con los datos de la donadora y del semental utilizado, y con la ayuda de un congelador manual, o una congeladora computarizada, se enfría lentamente hasta -7°C , se provoca que empiece a formarse hielo en la solución, luego se enfría más lentamente hasta -35°C ; finalmente se pasan las pajillas al tanque con nitrógeno líquido a -196°C , donde se almacenan los embriones hasta ser descongelados y transferidos.

Los embriones, dice, se descongelarán en forma parecida a la descongelación del semen, colocando la pajilla en baño maría a 37°C durante 20 segundos, luego se extrae el embrión de la pajilla y, observándolo al microscopio, se pasa por varias soluciones con concentraciones decrecientes de un azúcar, sacarosa, para retirarle el Glicerol que se le puso antes de congelarlo, se vuelve a evaluar la calidad del embrión y se transfiere a la vaca receptora. La bipartición embrionaria consiste en dividir los embriones de calidad 1 y 2 por la mitad para formar dos embriones y aumentar así el número de crías de cada donadora, se efectúa con un aparato llamado micro manipulador, que permite sujetar el embrión para cortarlo por la mitad con una micro navaja; las dos mitades resultantes pueden transferirse una a cada receptora o las dos a la misma, y ambas crías serán del mismo sexo.

De Bem *et al.* (1994), refieren que el mecanismo de la criopreservación no está totalmente aclarado, sin embargo se sabe que es imposible la crio preservación sin la presencia de sustancias capaces de mejorar la sobrevivencia celular después del congelamiento, denominados “crio protectores”, los mismos que se integran con la membrana celular proporcionando una estabilización que evita la ruptura de la misma durante el proceso de congelamiento. Los crio protectores se clasifican de acuerdo a su permeabilidad con la membrana celular, así, se tienen: los intracelulares como el glicerol, dimetil, sulfoxido, 1,2 propanediol, etanol y otros alcoholes y además los extracelulares como la sucrosa, glucosa y otros azúcares.

Gatica *et al.* (2002), muestran los primeros resultados de sobrevivencia de embriones bovinos vitrificados a los 7 y 10 días de cultivo *in vitro*, en una publicación escriben *-citando a otros autores-* que el empleo de embriones congelados posibilita utilizar eficientemente donantes y receptoras; incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie; transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia; controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados

libres de ellas; crear bancos de embriones de valor pecuario, entre otras, Thiber (1999).

Al conservar embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196°C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc., es decir; reducir drásticamente la actividad fisiológica de la célula, así es posible almacenar embriones durante un largo período sin afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos (Schneider y Mazur, 1984); Gordon, 1994; Tanaka *et al.*, 1997). Este hecho, convierte a la congelación de embriones en una herramienta insustituible para el comercio internacional de reproductores.

Sostienen que, en la actualidad. La “crio conservación” de embriones de mamíferos ha llegado a ser un procedimiento rutinario en biología, ganadería y medicina, pudiendo lograrse por procedimientos de congelación estándar y por vitrificación. A pesar de los beneficios prácticos, ventajas económicas y buenos resultados que se han obtenido experimentalmente, la vitrificación no se ha utilizado masivamente debido a la falta de estandarización de los protocolos. Al referirse a los “crioprotectores” manifiestan que, los embriones al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formación de cristales que lesionan las estructuras citoplasmáticas citando a Mazur (1984), esta óptima deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación.

Expresan además que, en la “congelación” de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores 1.- Los Permeables o Intracelulares.- que son de bajo peso molecular como el glicerol (G), dimetil sulfoxido (DMSO), 1 - 2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma, citaron a Miyake *et al.* (1993) y 2.- Los Impermeables o Extracelulares.- que son de alto peso molecular como la polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares, citan a Kuleshova *et al.* (1999), estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; deshidratan junto con el crioprotector las células de los embriones durante el equilibrio (Sommerfeld y Nieman 1999).

Cuando se refieren a la “conservación” de embriones dice que éstos pueden ser conservados, *in vitro*, para su posterior transferencia mediante cultivo a temperatura ambiente, refrigeración entre 0 a 4°C o congelación a -196°C.

También hacen referencia a la “conservación a temperatura ambiente”; un paso indispensable en la transferencia de embriones es la conservación temporal de embriones recobrados de una donadora antes de ser transferidos o congelados, ésta se realiza en un medio de Solución Buffer Fosfato (PBS), suplementado con 10% de suero, una fuente de proteínas que reduce la tensión superficial favorece la sedimentación, evita que los embriones se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación, incorpora sustancias promotoras del crecimiento que favorecen su desarrollo, absorbe e inhibe metales pesados tóxicos que puedan estar presentes en el medio. La viabilidad embrionaria declina después de 12 horas (Palma y Brem 1993).

En cuanto a la “refrigeración”, relatan que, ha quedado claro que embriones de bovinos mantenidos en un medio no nutritivo por un largo tiempo y a temperatura ambiente decrece 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, la refrigeración se efectúa vehiculizando los embriones en PBS envasados en pajuelas de 0.25 ml y colocadas en un refrigerador, se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura, de manera similar a como se realiza la estabilización del semen, la refrigeración de embriones puede ser considerada como una alternativa interesante cuando no sea posible recurrir a la congelación.

De la “congelación estándar” dicen que, este método de congelación posibilitó a Wilmut y Rowson. (1973) obtener el primer ternero nacido de la transferencia de un embrión congelado. Al método estándar se le han efectuado desde entonces distintas modificaciones tendientes a su simplificación. En este método la exposición de los embriones al medio de congelación (PBS + G) debe realizarse a temperatura ambiente: 20 a 22°C, en un solo paso, de 10 a 30 minutos de duración, Chupin y Procureur. (1984); Niemann. (1991), este período incluye el envasado de los embriones en pajuelas plásticas esto permite realizar más rápidamente y con mayor precisión la inducción de la cristalización o “seeding” Maurer, (1978); las pajuelas deben ser colocadas en un equipo de congelación a -7°C durante 5 minutos para equilibrar la temperatura de las pajuelas con la del equipo; el seeding se realiza poniendo en contacto la superficie de la pajuela con una placa metálica enfriada con nitrógeno líquido (N₂L); el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido, alcohol o etanol enfriado por medio de un compresor.

Complementan indicando que el no inducir la cristalización o seeding conduce a la formación de cristales de hielo bajo un estado de súper enfriamiento y a una elevación repentina de temperatura (se genera calor latente de -10°C a -15°C), resultando un severo trauma físico dañar las células, Niemann (1995).

Una vez efectuado el seeding, se mantiene la temperatura estable durante 10 minutos (período de estabilización) y luego desciende la temperatura a una velocidad de 0.1°C y 0.5°C hasta -30 o -35°C para establecer un adecuado balance entre deshidratación y formación de hielo intracelular, en este momento las pajuelas pueden ser retiradas del equipo de congelación y sumergidas en nitrógeno líquido, Lehnjensen y Greve. (1982). La descongelación se realiza de manera rápida, sumergiendo las pajuelas en baño María a 30 o 35°C durante 20 a 30 segundos.

Estos autores describen la “congelación rápida” e indica que este método fue desarrollado por Chupin (1986). Los embriones son deshidratados parcialmente como ocurre en el método estándar, luego se les deshidrata nuevamente colocándolos en una solución mixta de glicerol y sucrosa, esta segunda deshidratación deja a los embriones en condiciones de ser enfriados rápidamente. Las pajuelas son colocadas en el cuello del termo de nitrógeno, durante 5 minutos, posteriormente son sumergidas al N₂L. Los resultados obtenidos fueron dispares, según el estadio de desarrollo del embrión congelado. Manifiesta que realizaron modificaciones, congelando ovocitos en gradillas de microscopio electrónico con 1 μl de EG sumergiéndolas inmediatamente en N₂L obteniendo tasas de sobrevivencia semejantes a los de ovocitos expuestos al EG, pero sin congelamiento.

Recomiendan que, para tener buenos resultados se deben tomar en cuenta los siguientes factores: volumen de la muestra, concentración de crioprotector, método de adición, temperatura y tiempo de equilibrio, solidificación, tasa de enfriamiento y cambios en el volumen, debido a que estos factores están estrechamente relacionados con la permeabilidad y la toxicidad del crioprotector.

Finalmente, mencionando a otros autores agregan, que el máximo daño en el embrión durante el enfriamiento ocurre de -15°C a -16°C debido a la fase de transición de la membrana lipídica, esta fase se ve afectada por la fusión de los liposomas afectando el termo comportamiento de las membranas en la transición de líquido a gel, Zeron *et al.* (2000) y la velocidad de penetración de los crioprotectores, Thompson. (1997), *et al.* (2000). El daño celular incluye pérdida de microvellosidades, disrupción de la membrana plasmática, cambios mitocondriales,

hinchamiento del retículo endoplásmico, pérdida de uniones entre células así como fractura de zona pelúcida.

Malson (2004), relata que, el congelar embriones de alta calidad permite a los productores tener tiempo para buscar mejores oportunidades genéticas ya que los embriones congelados pueden ser enviados a otros productores para ser transferidos en otras receptoras, cuando sea conveniente. Hay dos métodos de congelamiento usados actualmente. Uno utiliza glicerol y el otro etilenglicol como medios congelantes, el método que usa 10 % de glicerol ha sido usado desde 1980 y requiere el uso de un microscopio para descongelar los embriones, ya que el glicerol es removido del embrión a través de un método de disolución, rebajando la concentración de la sustancia o usando una preparación que remueve el congelante de las células. El otro método utiliza 1.5 molar de etilenglicol para liberar los embriones; esta técnica se ha transformado en la favorita por los profesionales porque no es necesario el uso de un microscopio en el momento de la descongelación, en este caso la descongelación es similar a la del semen, y los embriones se transfieren al animal receptor. Por lo que la rehidratación del embrión se lleva a cabo dentro del útero de la vaca receptora usando sus propios fluidos.

Luna del Campo (2006), en su artículo “Conservación de Embriones Bovinos” publicado en esta página, relata que el proceso de crio preservación de embriones se realiza en dos fases, la congelación y la descongelación, la congelación consiste en envasar los embriones y deshidratar las células al mismo tiempo que se desciende la temperatura hasta congelarlas protegidas por sustancias crio protectoras (Glicerol o Etilenglicol, Sucrosa), hasta temperaturas entre -30 y -38°C , luego son conservados en termos de Nitrógeno líquido a -196°C sin límites de tiempo hasta la descongelación; la segunda fase de descongelación, consiste en el proceso inverso, elevar la temperatura y rehidratar las células hasta alcanzar límites fisiológicos compatibles con la supervivencia embrionaria, para luego e inmediatamente transferirlos al útero de una receptora.

Acuña (2006), manifiesta que, los embriones obtenidos tras el lavado se pueden manipular de diversas formas, así pues; el mantenimiento de los embriones en medio de cultivo a temperatura ambiente es el modo más efectivo y fácil de superar un intervalo corto de tiempo (de varias horas) y de gran interés es la crioconservación en caso de tratarse de periodos de tiempo más grandes o de obtener que salvarse distancias considerables (comercio de importación / exportación, escasez de

receptoras, reserva genética, exámenes analíticos previos a la transferencia / tipificación del genoma, etc.

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

Sin embargo el mantenimiento de las características originales del embrión (metabolismo y capacidad de crecimiento) tras la congelación es únicamente posible con la utilización de crioprotectores y de diferentes protocolos de congelación. Este autor precisa algunas etapas como:

Congelación.- Los embriones aptos para la congelación son aquellos que, según el examen de sus características morfológicas, presentan una calidad excelente (Clase 1) con ningún tipo de degeneración o con pequeños indicios de ella. La congelación de los embriones se realizará, dependiendo del equipamiento del laboratorio, en un baño de alcohol o en la cámara de refrigeración de una máquina de congelar embriones; las pajuelas con los embriones se sumergen según la técnica o bien a 6°C (método estándar y método one step) o a -6°C (método directo) en la máquina de congelación y se conservan congelados.

Los embriones equilibrados con glicerina como crio protector se refrigeran en la máquina de congelar de 6 hasta -6°C a una velocidad de 1°C por minuto. Cuando se utiliza etilenglicol como crio protector se comienza directamente con una temperatura de 6°C pudiéndose introducir estos embriones en la máquina de congelación cuando haya alcanzado esta temperatura y congelarlos junto a los embriones en glicerina.

Primero se congela en glicerina y se refrigeran hasta -6°C , en un tiempo de 10 a 15 minutos; en el que se incuban, preparan y mantienen los otros embriones para congelar con el método directo; las pajuelas con los embriones se encuentran en la congeladora se induce la cristalización (seeding) a -6°C y se mantienen a esta misma temperatura durante 5 minutos; la cristalización se induce manualmente con una pinza sumergida previamente en nitrógeno líquido o automáticamente mediante un programa moderno de congelación con sustancias crio estáticas y luego se baja de 0.5°C por minuto hasta el final del programa de congelación. La temperatura final de

congelación es de -35°C y se alcanza más o menos una hora después tras ello se introducen las pajuelas en el nitrógeno líquido donde podrán ser almacenadas hasta su utilización.

Descongelado. .- El descongelado de los embriones crío preservados se realiza de diferente manera según la técnica seguida durante el congelado y debe llevarse a cabo siguiendo estrictamente las indicaciones precisas, principalmente cuando se trata de embriones comprados.

Además, los certificados de sanidad, certificados genéticos de origen de los padres, un protocolo de congelado con instrucciones para el descongelado donde se detallan los pasos necesarios para la dilución del crío protector. Se han desarrollado protocolos estándar de descongelado, de uso ya común, para cada uno de los diferentes métodos de crío preservación, de esta manera se extraen las pajuelas con los embriones congelados del nitrógeno líquido según las indicaciones pertinentes, se mantiene 15 segundos en el ambiente y a continuación otros 15 segundos en agua caliente a 30°C donde descongelan; luego se secan las pajuelas, se quita el bastón o tapón rotulado (stick) y según la técnica de congelado, o se someten a una manipulación previa (dilución de la glicerina) o si, son embriones conservados en etilenglicol, se transfieren directamente.

2.3.16 Resultados de la biotecnología

Aller *et al.* (2000), en sus trabajos de investigación “Gestación con embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos recuperados de vacas Ovariectomizadas de la raza Holando Argentinas”, realizaron el diagnóstico de preñez por palpación rectal 55 días después del transplante de los embriones, la eficiencia de gestación obtenida con embriones de 7 días fue de 35.5% y significativamente mayor ($P<0.05$) a la obtenida con embriones de 8 días (16.6%).

Asprón (1992), en su artículo “Transferencia de Embriones - Biotecnología de Punta”, publicado en la Revista Científica Técnica de la Organización Mundial de Sanidad Animal, muestra los siguientes resultados:

- 5 o 6 folículos maduros después de la superovulación con FSH.
- 5 o 6 cuerpos lúteos en cada ovario, después de la superovulación.
- 4 o 5 embriones transferibles por donadora súper ovulada.

- 33% de las donadoras súper ovuladas no producen embriones.
- 50 a 60 % de gestación con embriones frescos o refrigerados calidad 1 y 2
- 30 a 35% de preñez con embriones frescos o refrigerados calidad 3
- 50% de gestación con embriones bipartidos.
- ó 4 súper ovulaciones seguidas de cada donadora (con intervalo de 60 a 90 días), antes de cargarlas para darles un año de descanso reproductivo.

Bó, *et al.* (1999), manifiestan que, entre un 20 y 30 % de las donantes no producen ningún embrión transferible; esta variabilidad puede estar influenciada por factores relacionados con el tratamiento superovulatorio o en mayor medida por factores individuales de la vaca, asociados a las características de la dinámica folicular ovárica. En un trabajo de investigación que ellos realizaron en Córdoba - Argentina, referente a la respuesta superovulatoria, en vacas de leche; superovuladas los días 8 - 12 post celo, encontraron que con el tratamiento tradicional: Folltropin-V, obtuvieron después de la colección los siguientes promedios:

Tabla 5. Promedios obtenidos como respuesta súperovulatoria.

Tratamientos	Ovoc./embriones. totales	Fertilizados	Transferibles
Folltropin-V	8.5	6.4	4.8
Progestágenos +E-17B	9.1	6.7	5.2

Fuente: Bó, G. A. y R. J. Mapletoft., 1999.

Becaluba (2012), especialista en Reproducción Animal en Buenos Aires - Argentina, explica que, el objetivo principal de los tratamientos de superovulación en el ganado bovino lechero 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 a estos tratamientos es muy variable y difícil de predecir por muchos factores. Indica que en un trabajo de investigación que incluyó 2048 recolecciones de embriones en donantes bovinas, se obtuvieron un promedio de 11.5 embriones/ ovocitos, 6.0 embriones por vaca y 5.2 embriones transferibles por vaca; pero lo más importante que se destacó en este trabajo fue la gran variabilidad en la respuesta a la superovulación y en la producción de embriones; el 24% de las recolecciones no produjeron embriones viables, 64% de las donantes produjeron menos embriones transferibles que el número promedio y 30% de las recolecciones

produjeron el 70% de los embriones. En otro estudio retrospectivo que incluyó 1263 donantes, el autor encontró que el 68% de las hembras inducidas a superovulación produjeron embriones transferibles; el 32% restante lo integraron: 7% sin estimulación ovárica, 7% sin recolección de ovocitos ni embriones, 17% sin embriones transferibles, 1% donde no se efectuó la colección porque presentaron celo antes de administrárseles la PGF-2 α durante el tratamiento hormonal.

Estos trabajos muestran la alta variabilidad en la respuesta súperovulatoria que crea muchos problemas que afectan tanto la eficiencia como la rentabilidad de los programas de transferencia de embriones. Y en su investigación “Factores que Afectan la Superovulación en Bovinos” realizado en Buenos Aires - Argentina. (2012), muestra claramente la respuesta súperovulatoria encontrada en vacas y vaquillonas de leche súper estimuladas en los días 8 y 12 post celo, utilizando FSH. De esta manera:

Tabla 6. Respuesta súperovulatoria con FSH.

HOLANDO				% de preñez
N° de vacas	Ovocitos/Embriones totales/animal.	Embriones por vaca	Embriones transferibles	Embriones Clase 1 y 2
254	8.9	6.1	5.1	48.4

Fuente: Becaluba, 2012.

Encontró además, que entre los factores que afectan la superovulación y la calidad de los embriones están:

- a. Los factores relacionados con la utilización de las gonadotrofinas sintéticas y con los protocolos utilizados en el proceso.
- b. La viabilidad de los folículos y la onda folicular en el momento que los tratamientos son iniciados.
- c. Factores ligados al animal: tanto la tasa ovulatoria como el número de embriones viables producidos son caracteres relativamente inherentes a cada donante; los animales que tienen respuesta baja en un tratamiento, probablemente responderán en forma similar en los tratamientos subsecuentes y los que responden bien inicialmente, continuarán haciéndolo en esta forma.

- d. La raza: las vacas de raza Holstein requerían una proporción mayor de FSH mientras que las vacas de raza Charoláis requerían una menor proporción, en el proceso de superovulación.
- e. La estación del año: los extractos pituitarios purificados como: Folltropin®-V, han sido más eficaces que FSH-P (que es menos purificado), cuando se utilizaron en condiciones de estrés por el calor, pero no fueron diferentes en condiciones ambientales con temperaturas moderadas, estos estudios fueron realizados con vacas Holstein en florida, en cambio, en un estudio realizado en vaquillonas Brahaman en Argentina, se obtuvieron efectos opuestos encontrando una mejor respuesta en los animales tratados con los preparados menos purificados en verano que en invierno, la conclusión al respecto fue que las temperaturas de invierno podrían ser estresantes en la raza Brahaman , por lo tanto, en condiciones de estrés climático las vacas responden mejor a los extractos más purificados.
- f. La edad: el efecto que tiene la edad de la donante sobre la respuesta súperovulatoria ha sido ampliamente estudiado en el ganado lechero, el número de embriones transferibles obtenidos en donantes cuyas edades estaban comprendidas entre 3 y 6 años, resultó mayor que el que se logró en vaquillonas y primíparas. Menciona Becaluba, F. a Hanselmann (1995), quien efectuó un estudio retrospectivo en el que analizó la respuesta súperovulatoria de 197 donantes, agrupándolas en tres categorías, hasta 5 años, de 6 a 8 años y mayores de 8 años, el promedio de embriones transferibles fue de 5.2, 6.0 y 3,2 respectivamente.
- g. El estado nutricional: el nivel de energía de la ración influye tanto en las tasas de ovulación y de fecundación como en la viabilidad de los embriones.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del lugar de estudio

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Producción Illpa (CIP-Illpa), de la Facultad de Ciencias Agrarias UNA –Puno, localizado al lado izquierdo del km 19 de la carretera asfaltada Puno-Juliaca. Geográficamente se encuentra ubicado a 70° 40' 50" de longitud Oeste y a 15° 42' 50" de latitud Sur y a 3,527 msnm de altitud (caserío).

El CIP Illpa colinda por el Este con el sector Cancharani pampa y la carretera asfaltada Puno Juliaca, por el Noreste y Oeste limita con la comunidad Yanico Rumini Mocco, por el Norte limita con INIA Illpa Puno, específicamente con el río Illpa en medio y por el Sur limita con la comunidad campesina de Alianza Chali.

El CIP Illpa cuenta con un total de 420 has, de los cuales 323 has son pastos naturales, 23 has son pastos cultivados y 68 has son terrenos cultivados y 6 has constituyen instalaciones pecuarias, caserío y vías de acceso al CIP Illpa FCA UNA Puno, 220 has constituyen pampas y el resto constituyen laderas y cerros.

3.2 Características ecológicas

El área del centro de investigación y producción Illpa, de acuerdo al mapa ecológico del Perú, basado en la clasificación de zonas de vida del mundo por Holdridge (1985,) pertenece a la zona ecológica bosque húmedo montaño sub-tropical (bh-ms), caracterizada por presentar temperaturas de 6 a 12°C con precipitaciones de 500 a 750 mm por año.

3.3 Características climáticas

Las condiciones de clima del CIP – Illpa, definidas por características básicas como, la temperatura, precipitación, humedad relativa y la evapotranspiración dan como resultado un clima frío y seco en invierno, templado frío y semiseco el resto del año, en forma general. Tipificaciones climáticas más específicas realizadas por ONERN - CORPUNO (1975), asignan 2 tipos climáticos, sub tipo climático “B” la zona ladera y el sub tipo climático “B” la zona ladera y el sub tipo climático “C” la zona planicie.

Sub tipo climático “B” Clima del altiplano de laderas bajas, la temperatura fluctúa entre 3°C y 13°C ubicada entre las costas de 3825 a 4000 msnm.

Sub tipo climático “C”. Clima del altiplano se caracteriza porque la temperatura fluctúa entre 6°C y 13°C comprende el mayor porcentaje del área del altiplano, especialmente áreas fisiográficas de planicie, entre las costas de 3820 a 3825 msnm.

3.4 Material experimental

3.4.1 Tipo de estudio

Esta investigación corresponde al tipo experimental comparativo. De manera que en el presente experimento se pondrá en práctica tres programas o protocolos diferentes para la superovulación y la producción de embriones con la finalidad de evaluar cuál de los protocolos resulta ser más eficiente en la producción de mayor cantidad y calidad de embriones viables, también se evaluará el porcentaje de preñez en las receptoras aplicando el protocolo de sincronización de estro para la transferencia del embrión a tiempo fijo.

3.4.2 Vacas donadoras PDP

Para el estudio se seleccionaron un total de Tres (3) vacas donadoras de embriones de raza Brown Swiss PDP de alta calidad genética registradas en la asociación Brown Swiss del Perú y la Asociación de criadores de ganado registrado (Ascrigar), las mismas que se detallan en la Tabla Registro de pedigree de las donadoras de embriones en la Asociación Brown Swiss del Perú y Ascrigar.

Tabla 7. Registro de donadoras de embriones

N°	N° de Registro	Fecha de Nacimiento	Tatuaje Oreja/Der	Nombre
01	18348	20/12/2004	014	CDB ACE COLLECTION CAMELIA
02	01092	30/09/2007	1066	DVC VASCO AYTOLA TORNINA
03	2174	14/06/2008	I-120	YRP COLECTION ZEUZ MELLISA

3.4.3 Vacas receptoras:

Para el estudio se seleccionó un total de cuarenta y siete (47) vacas receptoras de raza Brown Swiss PPC de 3 lugares; CIP Illpa FCA - UNA Puno, Sector de Istarata – Nuñoa, Fundo Sucari – Asillo y Centro Poblado de Collacachi sector Central. La identificación y selección de animales se dieron por el normal desarrollo del ciclo estral y sistema reproductivos.

3.4.3.1 Factores de estudio y tratamientos:

a) Tiempo de retiro de CIDR

P1= Retiro del (CIDR) a las 12 horas

P2= Retiro del (CIDR) a las 24 horas

P3= Retiro del (CIDR) a las 36 horas

b) Vacas donadoras

- D1.-Camelia

- D2.-Tornina

- D3.-Mellisa

Tabla 8. Distribución de tratamientos de los factores en estudio

R	D1. Camelia			D2. Melissa			D3.Tornina		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
1	D1 P1	D1 P2	D1 P3	D2 P1	D2 P2	D2 P3	D3 P1	D3 P2	D3 P3
2	D1 P1	D1 P2	D1 P3	D2 P1	D2 P2	D2 P3	D3 P1	D3 P2	D3 P3

3.4.3.2 Materiales, medios y equipos

a. Materiales de laboratorio

- Sonda de Foley
- Catéter de inseminación
- Funda de Inseminación
- Camisa Sanitaria
- Guantes obstétrico (100/caja)
- Jeringas de 05 ml
- Jeringas de 10 ml
- Jeringas de 20 ml
- Placa petri redonda
- Placa petri cuadrada
- Acrodiscos milipore
- Manguera colectora + filtro
- Pajillas 1/4 -gama irradiate
- Pajillas 1/4 - gama irradiate DT

- Pajuelas 1/2 pkt 5
- Tapón de pajuelas con adaptador de 1/4 a 1/2
- Dilatador cervical
- Micropipetas Agujas 21 - 1*1/2
- Agujas 22 - 1*1/2
- Pipetas de plástico
- Funda de transferencia de embriones

b. Medios

- CIDR pkt/10
- Benzoato de estradiol 10ml
- Folltropin FSH 20ml
- Lutalise LH 30ml
- Hormona GnRH 10ml
- Cipionato de estradiol 10 ml
- Folligon
- Alcohol 96°
- Yodo
- Algodón
- Papel toalla
- Nitrógeno líquido
- Lidocaina 2% frasco/20 ml
- Complete flush
- Medio de congelación de embrión
- Medio de mantenimiento
- Pajuelas con semen congelado
- Gel lubricante
- Oxitetraciclina 250
- Vitamina ADE 50ml
- Fósforo inyectable 250ml
- Selenio inyectable 250ml

c. Equipos

- Micropipeta mecánica 5um
- Aplicador CIDR
- Estereoscopio electrónico

- Congeladora de embriones
- Termocupla
- Etiquetadora automática de embriones
- Estabilizador
- Corta pajilla pinza de plástico
- Termo criogénico
- Catéter de transferencia de embriones
- Cámara fotográfica
- Termómetro digital

3.5 Metodología de ejecución experimental

Para desarrollar la parte experimental de este trabajo de investigación, en primer lugar fue necesario un lapso de 385 días calendario máximo con la finalidad de desarrollar los procesos referente a la superovulación (aplicación de hormonas), lavado o recogida (utilización de equipo y medios), búsqueda de embriones en el estereoscopio, embasamiento en pajuelas de 0.25 ml y congelación estándar de los embriones (-196°C), de acuerdo a las recomendaciones y normas técnicas establecidas por la International Embryo Transfer Association (IETA), el mismo que fue aplicado con el rigor que exige esta biotecnología y finalmente la transferencia de los embriones a receptoras y la evaluación de gestaciones en las receptoras.

En el proyecto de investigación planteado constó de una serie de actividades para su ejecución, las cuales se describen a continuación:

3.5.1 Evaluación de vacas donadoras

- a. Se seleccionaron dos (3) vacas de raza Brown Swiss PDP de alta calidad genética, con buen historial reproductivo y producción de leche (registro adjunto en anexo).
- b. Se comprobó que no tenían parentesco con el semental a usar en la inseminación artificial durante el estro superovulatorio.
- c. Las vacas donadoras estuvieron ubicados en el CIP- Illpa UNAP, (1 vaca), y las otras en el sector de Istarata – Distrito de Nuñoa Provincia de Melgar (2 vacas).
- d. Teniendo en cuenta las recomendaciones de la International Embryo Transfer Association (IETA), desde el punto de vista reproductivo fueron seleccionadas

mediante el examen ginecológico para comprobar si el animal es idóneo o no como donadora.

- e. Las vacas donadoras cumplen con un puerperio normal, con cortos periodos entre partos y bajo índice de inseminaciones por preñez.
- f. Se tomaron en cuenta la superioridad genética, sobresalientes en producción de leche (20 a más Lit./leche/día/vaca.), sin descuidar el fenotipo (carácter lechero, morfología, sistema mamario).
- g. Estuvieron con buena salud y condición corporal (3.5 en la escala americana), realizando la inspección visual y un chequeo ginecológico.



Figura 1: Donadora 1/ CDB ACE COLLECTION CAMELIA



Figura 2: Donadora 2 / DVC VASCO AYTOLA TORNINA



Figura 3: Donadora YRP COLECTION ZEUZ MELLISA

3.5.2 Selección de vacas receptoras

- a. Se realizó la pre-selección de 55 vacas receptoras para la aplicación del protocolo de sincronización para la transferencia de embrión a tiempo fijo.
- b. De las 55 vacas receptoras pre seleccionadas finalmente se seleccionó a 47 vacas, las que fueron declaradas aptas para transferir.
- c. La selección definitiva de éstas se llevó a cabo antes de la transferencia del embrión, según criterios ginecológicos.

- d. Se seleccionaron las vacas que cumplieron los mismos requerimientos exigidos para las vacas donadoras.
- e. No se tomaron en cuenta la raza ni el pedigrí.
- f. Buen desarrollo de la pelvis.
- g. Buena habilidad materna, dócil y joven.
- h. Se revisó los antecedentes para asegurar que tengan una producción de leche suficiente para criar su cría.
- i. Finalmente se calificó como *receptoras transferibles* a aquellas sin anomalías ni patologías ginecológicas y con un buen cuerpo lúteo de grado 3 el día de la transferencia y una consistencia uterina correspondiente al día del diestro en que se encuentra.

3.5.3 Superovulación de las donadoras

Sustentada en una serie continuada de dosis crecientes de FSH se procederá de acuerdo a protocolos que se plantea en la presente investigación, tal como muestra en las tablas N° 9; 10 y 11, para la presente investigación. El inicio de la inducción de la superovulación se realizó a través de la sincronización de estro, tomando el día cero en el momento que se desea iniciar el programa, no obstante se presentaron tres protocolos con diferentes horas de retiro de la progesterona (CIDR), con la finalidad de conocer cuál de los protocolos en investigación es más eficiente para la producción de mayor cantidad y calidad de embriones.

Tabla 9. Protocolo de superovulación de Donadoras P1 12 horas, modificado

Día	Evento
0	Dispositivo Intravaginal CIDR + B.E. 2ml.
4	FSH 80 mg 7AM + 80 mg 7PM
5	FSH 60 mg 7AM + 60 mg 7PM
6	FSH 40 mg 7AM + 40 mg 7PM+PG35mg7AM+PG35mg7PM+RET.P ₄ 7 PM
7	FSH 20 mg 7AM + 20 mg 7PM
8	Revisar celo y Gn _{rh} + Inseminación artificial 2 veces cada 12 h.
9	Inseminación tercera dosis
15	Colección de Embriones

Fuente: Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 2a ed. IETS. Champaign, Illinois. Estados Unidos de América (2004), Modificado por D. Marca, tesista.

Tabla 10. Protocolo de superovulación de donadoras P2 24 horas, modificado

Día	Evento
0	Dispositivo Intravaginal CIDR + B.E. 2ml.
4	FSH 80 mg 7AM + 80 mg 7PM
5	FSH 60 mg 7AM + 60 mg 7PM
6	FSH 40 mg 7AM + 40 mg 7PM + PG 35mg 7AM + PG 35mg 7PM
7	FSH 20 mg 7AM + 20 mg 7PM + RET. CIDR 7AM
8	Revisar celo y GnRh + Inseminación artificial 2 veces cada 12 h.
9	Inseminación tercera dosis
15	Colección de Embriones

Fuente: Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 2a ed. IETS. Champaign, Illinois. Estados Unidos de América (2004), Modificado por D. Marca, tesista.

Tabla 11. Protocolo de superovulación de donadoras P3 36 horas, modificado

Día	Evento
0	Dispositivo Intravaginal CIDR + B.E. 2ml.
4	FSH 80 mg 7AM + 80 mg 7PM
5	FSH 60 mg 7AM + 60 mg 7PM
6	FSH 40 mg 7AM + 40 mg 7PM + PG 35mg 7AM + PG 35mg 7PM
7	FSH 20 mg 7AM + 20 mg 7PM + RET. CIDR 7PM
8	Revisar celo y GnRh + Inseminación artificial 2 veces cada 12 h.
9	Inseminación tercera dosis
15	Colección de Embriones

Fuente: Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 2a ed. IETS. Champaign, Illinois. Estados Unidos de América (2004), Modificado por D. Marca, tesista.

Como muestra las tablas N° 9, 10 y 11, la variación está en el proceso del retiro del dispositivo Intravaginal contenido de Progesterona CIDR, en la tabla N° 9, del protocolo 1, el tiempo de retiro del CIDR es a las 12 horas, mientras que en la tabla N° 10, del protocolo 2, el retiro del dispositivo CIDR es las 24 horas y finalmente en la tabla N°11, del protocolo 3, el retiro del Dispositivo es las 36 horas, todos llevan el mismo tiempo de colección de embriones (a los 15 y 16 días).

3.5.4 Inseminación artificial de las vacas donadoras

Las donadoras mostraron estro superovulatorio tras la aplicación del Dinoprost tromentina (Lutalyse) el cual es un análogo sintético de la PGF₂ α . de manera que, cuando las vacas donantes entraron en estro y se realizaron los siguientes pasos:

1. se evaluó secreciones vaginales.

2. se procedió a inseminarlas artificialmente tres veces.
3. La primera a las 12 horas tras el comienzo del mismo, el siguiente servicio 12 horas después y 12 después del último; dando oportunidad a que la mayoría de óvulos sean fecundados.
4. Se utilizó semen importado americano de un toro probado y de buena calidad genética.
5. Para la donadora Cdb Ace Collection **Camelia**, con pedigree *Collectión X Ace*, que se inseminó con semen congelado del toro Hilltop Acres CT **Davenport** ET.
6. Para la donadora DVC Vasco Aytola **Tornina**, con Pedigree *Payof X Aytola*, también se inseminó con semen congelado del toro Hilltop Acres CT **Davenport** ET.
7. Para la donadora YRP Colection Zeuz **Mellisa**, con Pedigree *Eventide X Fronterizo*, también se inseminó con semen congelado del toro Hilltop Acres CT **Davenport** ET. (Catalogo adjunto en anexo).

La inseminación artificial se realizó con especial cuidado, puesto que la inseminación repetida de la vaca aumenta el riesgo de contaminación por gérmenes, lo que disminuiría o anularía totalmente el éxito de la transferencia de embriones, por ello los pasos que seguimos para el proceso son las siguientes:

1. Se evacuó del recto el estiércol para una mejor manipulación del sistema reproductivo.
2. Se limpió la vulva de la donadora a inseminar con agua y yodo al 2%
3. Se secó con papel toalla y rocío con alcohol 96°.
4. Se descongeló las pajillas en agua a 35 grados centígrados (En nuestra Región).
5. Se colocó la pajilla congelada en el termo de descongelación entre 20 a 40 segundos en el agua a 35°C.
6. Se sacó la pajilla descongelada del agua y se secó con papel secante.
7. Se cargó la pajuela con semen en el aplicador de inseminación artificial y se procedió a la inseminación depositando el semen justo al pasar la cérvix en el útero.

8. Después de haber depositado el semen correctamente, lentamente se retiró la pistola del tracto reproductor, verificándose que la punta de la pistola no tenga sangre, pus, o fugas de semen dentro de la funda.
9. Se tomó apuntes para futuras referencias sobre lo que consideró importante.
10. Por último se verificó cual fue el toro utilizado realizando el registro final de inseminación.



Figura 4: Introducción de la pistola inseminadora para la inseminación artificial a vaca donadora.

3.5.5 Sincronización estral a receptoras de embriones

Una vez que se tuvo los embriones obtenidas de las donadoras, se procedió a la sincronización de celo en las receptoras.

Se empleó un protocolo de sincronización para la transferencia de embrión a tiempo fijo así como muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Protocolo de sincronización y transferencia de embrión a tiempo fijo en vacas – modificado

Día	Evento
0	Dispositivo Intravaginal CIDR + GnRH 1.5ml.
7	RET. CIDR + Lutalyse 25 mg
9	GnRH 1.5ml
16	Transferencia de Embrión – Por la mañana o la tarde según el estadio del embrión.

Fuente: Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 2a ed. IETS. Champaign, Illinois. Estados Unidos de América (2004), Modificado por D. Marca, tesista.

3.5.6 Colección de embriones

Di-Bella (2009), menciona los pasos para el proceso de la colección de embriones (circuito cerrado), se cumplió paso a paso para un buen trabajo del proceso de colección, estos pasos se realizaron uno seguido del otro:

- a. La colección de embriones se realizó el día 7 después de la primera inseminación artificial.
- b. En este momento los embriones se encontraron en el extremo anterior del cuerno uterino lo cual facilitó su extracción.
- c. Se preparó y separó todo el material y equipo a utilizar.
- d. Las vacas donadoras se sujetaron eficientemente en un brete especialmente construido para ello.
- e. Se lavó la vulva con agua y yodo al 2%.
- f. Se secó y se roseó alcohol por todo el exterior de la vulva.
- g. Se colocó anestesia epidural.
- h. Se instaló la sonda de Foley en uno de los cuernos uterinos.
- i. Con suma cuidado se infló el globo de la sonda calculando el diámetro del cuerno uterino.
- j. Una vez instalado la sonda de Foley, se retiró el estilete y se conectó la manguera “Y” está ya previamente instalado al medio de colección y el vaso colector.
- k. Para el lavado se utilizó una solución salina PBS (phosphate buffered saline) y BSA fr. V (powdered) w/ Antibiotic/Antimicotic, o medios de colección preparados así como Complete Flush.
- l. El medio de colección se colgó en un colgador a 2.5m de altura, desde allí emitió por gravedad la caída del medio a los cuernos uterinos.
- m. Con la gravedad caerá el medio de colección la misma que se depositó por gravedad unos 80 a 120 ml de esta solución salina en el cuerno uterino, calculando que este no se llene demasiado por que puede causar hemorragias.
- n. Se masajeó suavemente el cuerno uterino y luego de abrir el clip de salida del medio hacia el vaso, vaciando el medio del cuerno uterino.

- o. Nuevamente se llenó con medio el cuerno uterino y se masajeó, esta operación se repitió entre 4 a 6 veces, dependerá de la operación del personal.
- p. Se cambió la sonda al otro cuerno para hacer la misma operación, para ello se desinfló el globo y se instaló el estilete haciendo la misma operación anterior para la instalación de la sonda en ese cuerno.
- q. El proceso de la colección de embriones se demoró en aproximado de 20 a 30 minutos por cada donadora.
- r. Terminado la operación del lavado uterino, se retiró la sonda y seguidamente se recogió el vaso colector para llevarlo al laboratorio y procedió a la búsqueda de los embriones.



Figura 5: Sistema de colección de embrión

3.5.7 Donantes después de la colección

Al segundo o tercer día de la colección de embriones se realizó un tratamiento intrauterino con algún antibiótico en este caso se utilizó oxitetraciclina (Emicina), para evitar cualquier tipo de infección del tracto reproductivo. Fue probable que se retrasen los estros subsiguientes de las vacas donantes, debido a la alteración endocrina forzada que sufre el ovario.

Por ese motivo fue necesaria la aplicación de la $PGF_2\alpha$ vía intramuscular, luego de la colección de los embriones para ordenar rápidamente el equilibrio hormonal del ovario, produciéndose la luteólisis de todos los cuerpos lúteos, retornando al estro después de 16 días a más.

3.5.8 Aislamiento y búsqueda de los embriones del medio de colección

Di-Bella (2009), menciona que después de la colección de embriones, el siguiente paso es la búsqueda de embriones y su crío preservación, los que se tomó en cuenta detalladamente, los mismos que se mencionan en lo siguiente:

- a. Una vez ingresado el vaso colector al laboratorio este a reposó un lapso de 5 a 10 minutos para que los embriones sedimenten
- b. luego se realizó la búsqueda de embriones en los materiales designados así como las placas petri diseñados para este trabajo.
- c. Para la búsqueda de los embriones se examinó con ayuda del estereoscopio a 10x y 20x, con luz difusa y frente a un fluorescente de luz ultravioleta.
- d. Los embriones que se encontraron se aspiraron con una micropipeta bajo control visual pasándolos a una placa de Petri pequeña redonda con medio de cultivo donde se agruparon todos.
- e. Una vez que se agrupó todos los materiales genéticos, embriones de diversas calidades y estadios, se procedió a la selección y clasificación de los embriones en una nueva placa petri redonda donde se tuvo el medio de mantenimiento de embriones (Holding).
- f. Se clasificó para el enjuague de los embriones solo el de calidad 1, los que se utilizaron para transferir y/o congelar.
- g. Se conservó a temperatura de ambiente hasta su transferencia o proceso de congelación.

3.5.9 Valoración y clasificación de los embriones

Este examen se realizó en el laboratorio ensamblado en el CIP Illpa. Los embriones tuvieron cierta diferencia en su desarrollo y en sus características morfológicas. Bajo la lupa estereoscópica con haz de luz difusa, entre 20x y 60x se examinaron los embriones encontrados teniendo en cuenta la descripción cualitativa y clasificación de los embriones bovinos de acuerdo a la escala que aparece en el manual of the International Embryo Transfer Society IETS (2004), como indica en la Tabla 13 y como se muestra en la Fig. 6

Tabla 13. Clasificación general de los embriones colectados.

Clases	Descripciones
Clase 1	Calidad excelente. Embrión esférico, <i>Zona pelúcida intacta</i> , cúmulo celular perfectamente estructurado con células del mismo tamaño color y textura
Clase 2	Calidad buena. Embrión esférico o ligeramente elipsoidal, <i>Zona pelúcida intacta</i> , algún blastómero suelto pero, por lo demás, cúmulo celular perfecto.
Clase 3	Calidad regular. Zona pelúcida intacta o dañada, blastómeros de diferentes tamaños, cúmulo celular con un 30 hasta un 60% de blastómeros intactos, ligero retraso del desarrollo (estadio de 32 células)
Clase 4	Calidad mala. <i>Zona pelúcida intacta</i> o dañada, blastómeros degenerados y sueltos en número considerable, cúmulo celular suelto y con menos del 30% de blastómeros intactos, desarrollo retardado con estadios embrionarios de blastómeros grandes (32,16 células). Embrión degenerado. <i>Zona pelúcida</i> , normalmente intacta, cúmulo celular con aspecto desorganizado y suelto, blastómeros de diferentes tamaños y pignóticos en muchos casos, estadios de desarrollo ya paralizado (2,4,8 hasta 16 células)
Nota:	<i>Solo serán transferidos o congelados sólo los embriones de calidad 1 y 2</i>

Fuente: Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS) 2004.

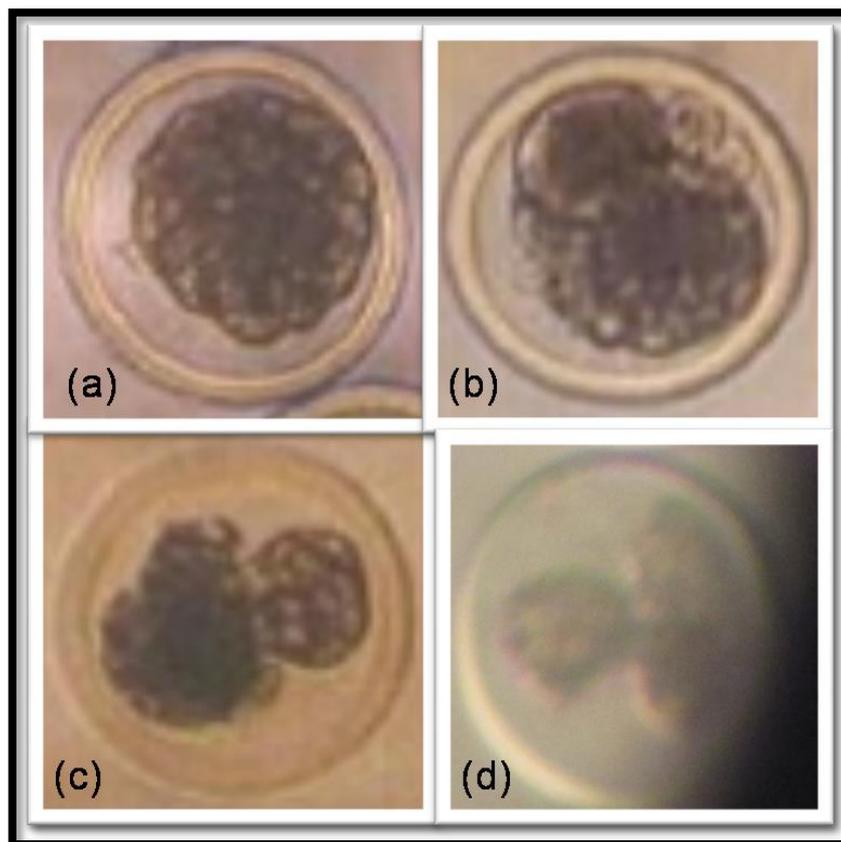


Figura 6: Embriones de calidad 1(a), calidad 2(b), calidad 3(c) y calidad 4(d)/clasificación por IETS 2004.

(En el proceso de estudio solo se transfirieron los embriones de calidad 1 - a).

3.5.10 Envasado del embrión en la pajueta

Para el empajillado de los embriones, estas ya sean para la transferencia directa o la congelación se toma en cuenta los siguientes pasos, las mismas que se tomó en cuenta lo recomendado por Di-Bella (2009):

- Se utilizó las pajuelas esterilizadas de 0.25 ml de volumen.
- Se utilizó una micropipeta adaptada a una jeringa de 1 ml y conectada a un extremo de la pajueta.
- Se tuvo especial cuidado al cargar primero el medio de congelación o de cultivo según sea para congelarlas o para transferirlas inmediatamente en fresco, hasta 1/3 de la pajueta; luego una burbuja de aire para evitar que el embrión se pierda al inclinar la pajueta, seguidamente se aspira bajo control visual al estereoscopio el embrión con 1cm lineal de medio de congelación, o de cultivo, después otra

- burbuja de aire, finalmente el medio de congelación o de cultivo hasta completar la pajuela.
- d. El embrión quedó situado en la parte central de la pajuela entre las dos burbujas de aire.
 - e. Se selló luego el extremo de la pajuela con un tapón adaptado a una pajuela de 0.5, en donde se colocó el registro del embrión.
 - f. La identificación de la pajuela consigna el nombre de la vaca donadora, el semental utilizado y la fecha de colección del embrión, calidad del embrión, estadio del embrión y la forma de transferencia.

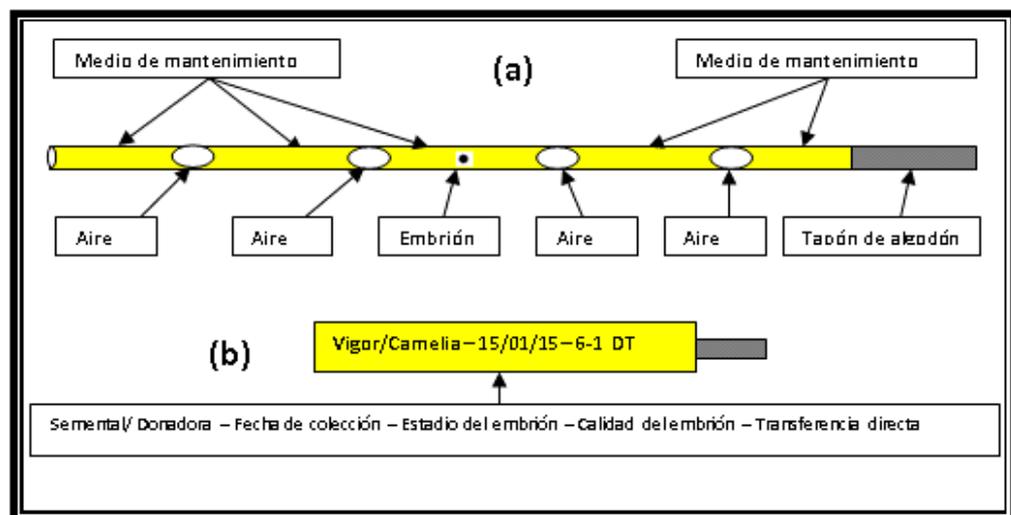


Figura 7: Sistema del empajillado de un embrión (a) y tapón con registro del embrión (b). Modificado y adaptado de Di-Bella (2009).

3.5.11 Conservación: refrigeración y congelación

Di-Bella (2009), menciona que los embriones obtenidos no deben de pasar por mucho tiempo fuera del útero. De manera que, los embriones clasificado para la transferencia en fresco se transfirieron lo antes posible, puesto que el útero ofrece las mejores condiciones para su supervivencia; el cultivo de los embriones durante tres a ocho horas no merma el resultado de las transferencias, sin embargo una vez superado este tiempo, se debe conservar embriones colectados de una donadora mediante refrigeración de entre 4°C a 8°C para provocar una ralentización del metabolismo celular que permite tener embriones viables hasta por 24 a 48 horas (conservación temporal).

En la crioconservación mediante congelación a -196°C en nitrógeno líquido, el objetivo es la interrupción total del metabolismo celular por un tiempo determinado arbitrariamente, los embriones se mantienen en una anabiosis artificial. Solamente se congelaron los embriones de “Calidad 1” siguiendo rigurosamente los pasos que menciona y recomienda Di-Bella (2009):

- a. Los embriones pasaron a solución de ethylenglycol por 5 minutos.
- b. En este periodo se empajillaron e identificaron y listos para pasar a la congeladora de embriones.
- c. Se regulo la congeladora a -6°C (negativo), de tal manera que cuando llego a -6°C se efectuó el “seed” o cristalización en la columna superior a la que contiene el embrión.
- d. Se esperó 10 minutos para iniciar la congelación y estas entraron en un descenso de temperatura de 1 grado/minuto hasta que lleguen a los -32°C -
- e. Se sacó los embriones de la congeladora que estuvo a -32°C directo al termo que contiene el nitrógeno líquido que estará a -196°C a un tanque criogénico para ser almacenadas y conservadas hasta su utilización.



Figura 8: Congeladora manual de embriones en proceso de congelamiento a base de nitrógeno líquido.

3.5.12 Transferencia de embriones

Se empleó el proceso del método no quirúrgico, por la vía natural; mediante la utilización de un catéter de transferencia de embrión, introduciéndose el catéter a través de la vagina, pasando por la cervix y cuerpo del útero, hasta depositar el embrión en el cuerno uterino del lado ipsilateral del cuerpo lúteo (transferencia ipsilateral); este método se denomina “*Técnica Transcervical*”. Y se llevó a cabo, al igual que la inseminación artificial por palpación rectal, y para ello se siguieron los siguientes procedimientos:

- a) Se sujetaron las vacas receptoras en un brete o guillotina.
- b) Con la mano enguantada se retiraron las heces del recto para facilitar el trabajo.
- c) Se determinó y evaluó la calidad del Cuerpo Lúteo (C.L.), y los que no tuvieron desarrollo del buen nivel del C.L. se descartó como receptora y cuando esto ocurre se reemplazó por otra receptora que se seleccionó con este fin al inicio del programa. (Esta evaluación del cuerpo lúteo se llevó a cabo teniendo en cuenta la escala sugerida por el manual of the International Embryo Transfer Association IETA 1^{ra} Ed.).
 - 1 (muy bueno): 15 a 25 mm de diámetro, con corona manifiesta.
 - 2 (bueno): 15 a 20 mm de diámetro, sin corona manifiesta.
 - 3 (regular): menos de 15 mm de diámetro, sin corona, con un folículo en cualquiera de los ovarios.
 - 4 (malo): cuerpo lúteo muy pequeño, acompañado de un folículo con un diámetro de 5 a 15 mm.
- d) Fueron seleccionados como receptoras solamente las vacas receptoras que presenten C.L. de escala 1 y 2 para transferir el embrión y luego se aplicó anestesia epidural en la base de la cola, 3 a 6 ml de lidocaína al 2%, para evitar las contracciones del recto y que permita manipular el útero sin dificultad.

El descongelamiento de las pajuelas se realizó según la técnica seguida durante el congelado, siguiendo estrictamente las indicaciones en el siguiente orden:

- a. Con una pinza se tomó la pajuela del tanque con nitrógeno líquido, y se la seca rápidamente con papel absorbente exponiéndola a temperatura ambiente durante

15 segundos y luego se sumerge al termo descongelador, que contiene agua a una temperatura de 33°C durante 12 segundos, donde se descongelan.

- b. Se sacó la pajueta del agua tibia y se secó prolijamente, sin agitarla y se cortó el tapón del extremo de la pajueta, con un cúter especial llamado corta pajuelas, siempre evitando agitarla.
- c. Se preparó la pistola de transferencia de manera semejante a una de inseminación artificial, seguidamente se encajó la pajueta que contiene el embrión seleccionado en el catéter de transferencia y deslizando el mandril de la pistola por sobre este catéter.
- d. Finalmente el catéter se protegió con una sobre funda para evitar contaminarlo, así; quedará lista para el depósito del embrión en el cuerno uterino de la receptora.
- e. Mediante el método transrectal se introdujo vía vagina hasta el cérvix el catéter protegido con la sobre funda.
- f. Seguidamente se jalo ligeramente de la camisa sanitaria hasta perforarse para pasar solo el catéter a la cérvix, cuerpo y cuerno uterino ya sin la funda.
- g. Una vez en el cuerno se avanzó el catéter muy cuidadosamente por lo menos hasta la curvatura mayor, o incluso, si es posible hasta en tercio anterior del cuerno y se dejó el embrión allí.

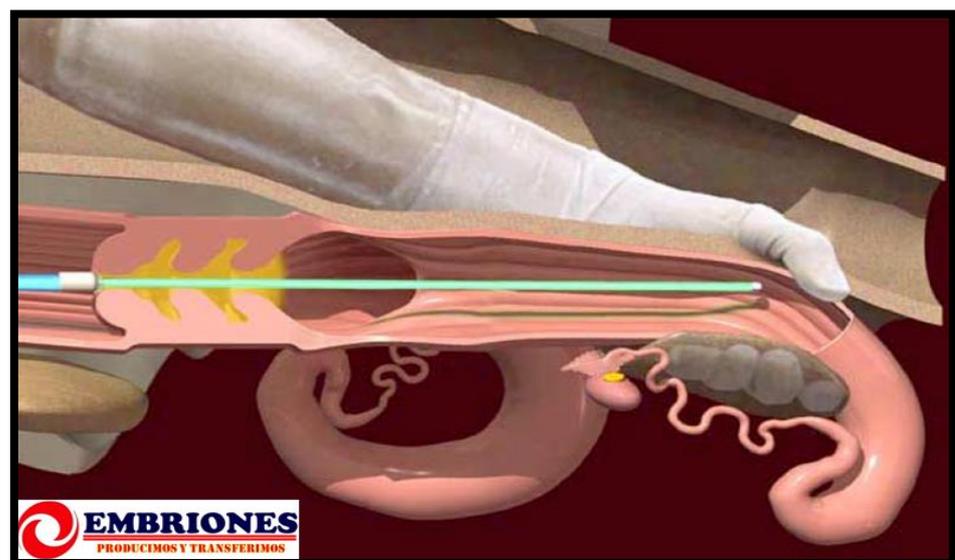


Figura 9: Introducción de la pistola de transferencia de embrión en el útero.

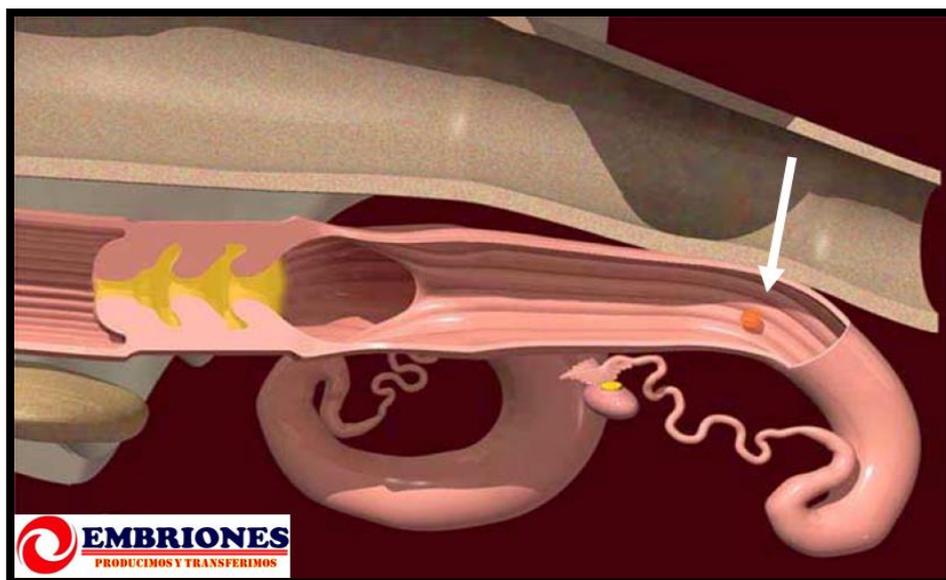


Figura 10: Cuerno uterino y lugar donde queda depositado el embrión.

3.5.13 Diagnóstico de preñez de vacas receptoras

Con la finalidad de tener seguridad en el diagnóstico de preñez, esta prueba de comprobación se realizó mediante el examen ginecológico por palpación rectal, a los 45 días después de haber transferido el embrión a las vacas receptoras registrándose los resultados en la libreta de campo.

3.5.14 Diseño de la escala de efectividad del programa de T.E.

Teniendo en cuenta la “efectividad” en la transferencia de embriones bovinos que actualmente alcanzan los países élite, en los que esta biotecnología se realiza de manera cotidiana, como son: Estados Unidos, México, Francia y Canadá entre otros, es del 55% a 60 %, en base a este porcentaje se constituyó la siguiente escala de efectividad:

Tabla 14. Niveles de efectividad en la transferencia de embriones bovinos.

Porcentaje	15 %	30 %	45 %	55 – 60 %
Calificación	malo	Regular	bueno	muy bueno

Fuente: International Embryo Transfer Association (IETA) 1ra Ed.

3.6 Análisis estadístico

3.6.1 Diseño Experimental

Para el análisis de estimación de la mejor hora del retiro del CIDR se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres tratamientos en estudio (tres protocolos de sincronización del estro). Cada tratamiento con 6 repeticiones.

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}; i = 1, 2, \dots, t; y j = 1, 2, \dots, r_i$$

Dónde:

Y_{ij} = variable de respuesta de la ij-ésima unidad experimental

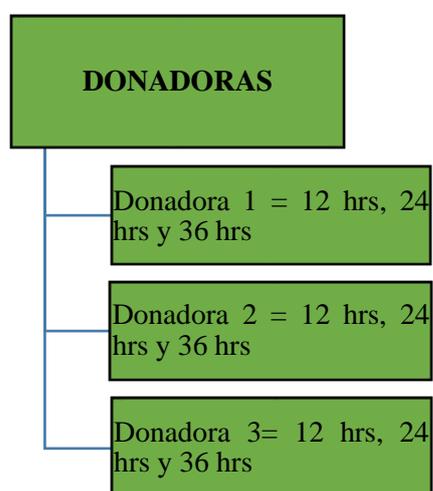
μ = media general de la variable de respuesta

τ_i = efecto del i - ésimo tratamiento (nivel del factor) en la variable dependiente.

ε_{ij} = error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental

Tabla 15. ANDEVA, Grados de libertad del diseño experimental (DCA) (Ibáñez 2009)

F.V.	G.L. (Det.)	G.L. (Det.)
Tiempo de retiro del CIDR	$t - 1$	$3 - 1 = 2$
Error experimental	$\sum_{i=1} (r_i - 1)$	$(6-1) + (6-1) + (6-1) = 15$
Total	$\sum_{i=1} r_i - 1$	$(6 + 6 + 6) - 1 = 17$



3.7 Variables de respuesta y observaciones

3.7.1 Variables de respuesta evaluadas

Básicamente se ha considerado las siguientes variables de respuestas:

- La hora del retiro de dispositivo (CIDR) en el proceso de producción de embriones viables a través de la superovulación en donadoras Brown Swiss PDP.
- Cantidad y calidad de embriones obtenidos de donadoras Brown Swiss PDP.
- Porcentaje de preñez de vacas receptoras transferidas de embriones.
- Costos de producción del embrión producido y transferido.

3.7.2 Observaciones

1. Ración alimenticia de las vacas donadoras y receptoras.
2. Aplicación de hormonas de regulación estral.
3. Estrés ambiental y de manejo en vacas donadoras y receptoras.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Tiempo del retiro de protocolos (CIDR) en el proceso de la superovulación en vacas donadoras Brown Swiss PDP

Para la estimación del mejor tiempo del retiro del dispositivo intravaginal CIDR para obtener la mejor respuesta de superovulación y en consecuencia mayor cantidad y calidad de embriones se planteó tres (3) protocolos de superovulación, en donde en el protocolo uno el retiro del CIDR es a las 12 horas después de aplicar la primera dosis de la Prostaglandina, mientras que el segundo protocolo de superovulación consta del retiro del CIDR a las 24 horas luego de la primera dosis aplicada de la Prostaglandina y el tercer protocolo después de las 36 horas de aplicado la primera dosis de la prostaglandina.

Desarrollados los tres protocolos de investigación, se obtiene los siguientes resultados que se muestran en la tabla N° 16, las mismas que se desarrolló aplicando el diseño experimental DCA, con 6 repeticiones en cada protocolo, teniendo en total 18 repeticiones y con 47 unidades experimentales.

Tabla 16. Número de embriones, calidad de embriones y óvulos.

Protocolos	Embriones de Calidad. 1	Embriones de Calidad. 2	Embriones Degenerados	Óvulos
P 1 = 12 Hrs.	23	1	2	5
P 2 = 24 Hrs.	50	4	7	10
P 3 = 36 Hrs.	31	3	3	15
Total	104	8	12	30

Los resultados de la tabla 16, muestran claramente que el protocolo P2, con retiro del CIDR a las 24 se obtuvo mayor cantidad de embriones viables de calidad 1 frente a los demás 2 protocolos, Seguido por el protocolo P3, con retiro del CIDR a las 36 horas y finalmente el protocolo P1, con retiro del CIDR a las 12 horas.

El proceso de la investigación consta en tener mayor cantidad de folículos superovulados para que estas puedan ser fecundadas y dar a nuevos seres vivos.

Aspróm (1992), en un trabajo de superovulación en vacas aplico la hormona estimulante de folículos FSH, que hace que en ambos ovarios desarrollen varios folículos los cuales ovularon después que la vaca haya entrado en calor al aplicarle la otra hormona que es la prostaglandina $PG_{2\alpha}$ dos días después de haber empezado a inyectarle FSH, la misma que se aplicó cada 12 horas durante 4 días. Este tratamiento superovulatorio que Asprón (1992) aplicó es en vacas donadoras que entraron en celo natural 9 días antes de la aplicación de la FHS, tal como muestra en la tabla N° 2 Pág. 41.

Así mismo Becaluba (2007), realiza el mismo tratamiento con la diferencia de 1 día en el inicio de la aplicación de FSH, es decir inicia el día 10 después que la donadora haya entrado en celo tal como muestra en la tabla N° 3, Pág. 42. La misma que también fue aplicado en el 2012 y reporta un trabajo realizado en Argentina con el mismo protocolo, y además Palomino (2000), también recomienda realizar la superovulación con FSH, entre el día 9 a 12 después del celo de la vaca donadora.

Los tres autores recomendaron y aplicaron los protocolos de superovulación calculando que la vaca donadora alcance el pico máximo de la concentración de progesterona entre los días 8 y 12 (Callejas, 1996), aplicando una sola dosis de PG_{2α} en la mañana del segundo día de superovulación. Los tres autores obtuvieron similares respuestas en la obtención de embriones de entre 4 a 5 embriones viables.

En el trabajo de investigación se realizó la superovulación el día 4 de la aplicación del dispositivo CIDR y el día 7 en la mañana aplicamos la primera dosis de PG_{2α}, donde desde ese momento de inicia el conteo de las hora para el retiro del CIDR, aplicación contamos las horas para el retiro del CIDR, donde en los tres protocolos planteados retiramos a las 12, 24 y 36 horas de aplicado la PG_{2α}, y la segunda dosis de prostaglandina aplicamos a las 12 horas luego de la primera dosis.

Aplicando los protocolos planteados en la investigación solamente el protocolo P1, con el retiro a los 12 horas del CIDR, tiene una similitud, y la otra cercana similitud con el Protocolo P3 con el retiro del CIDR a las 36 horas, pero habiendo una diferencia significativa con el protocolo P2 con retiro del CIDR a las 24 horas así como se muestra en la tabla 16.

Tabla 17. Cantidad de embriones viables obtenidos por cada protocolo y vacas donadoras

Vacas Donadoras	Repeticiones	N° Embriones Protocolo P1 = 12 hrs	N° Embriones Protocolo P2 = 24 hrs	N° Embriones Protocolo P3 = 36 hrs
Donadora 1	Repetición 1	5	9	5
	Repetición 2	4	9	4
Donadora 2	Repetición 1	5	11	7
	Repetición 2	3	9	5
Donadora 3	Repetición 1	2	5	5
	Repetición 2	4	7	5
Total número de embriones		23	50	31

El pico máximo de la concentración de la progesterona en la vaca de manera natural tiene una duración de 3 días lo que naturalmente no se puede manipular hormonalmente pero que si en el proceso de investigación con el dispositivo CIDR que se tuvo de manera artificial,

alargando así las horas de mayor concentración de progesterona, que, si bien es cierto según Hafez (1996), indica que las concentraciones elevadas de la progesterona Inhiben el estro y el pico ovulatorio de LH, interrumpiendo así el desarrollo de un nuevo folículo, Agregando a ello la aplicación de FSH ocurre la superovulación y mientras más tiempo haya la concentración de la progesterona habrá más folículos maduros ovulatorios.

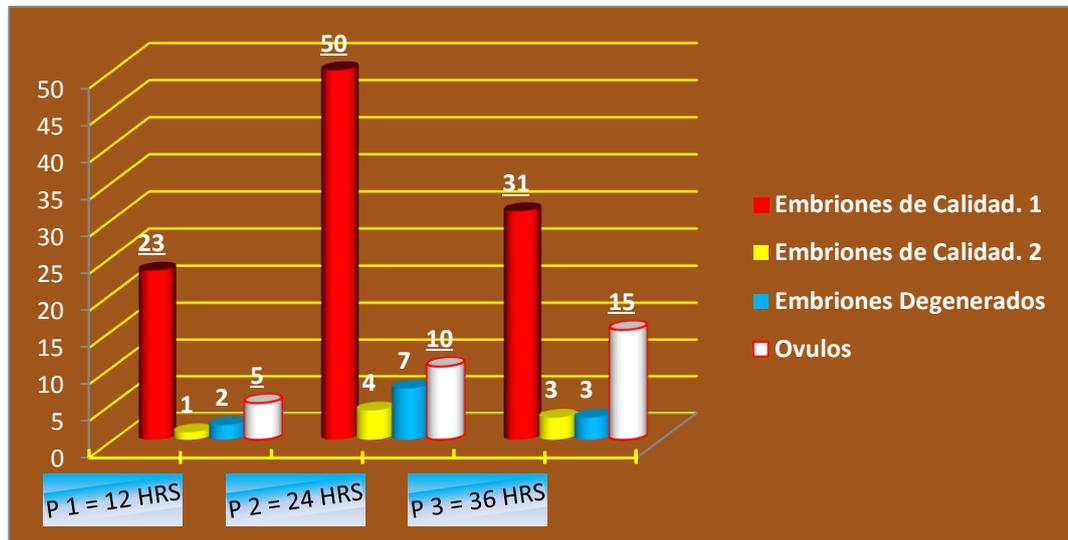


Figura 11: Cantidad de embriones de calidad 1, 2, degenerados y óvulos obtenidos por cada protocolo aplicado.

En la figura 11. Presenta las la cantidad de embriones, de calidad 1, calidad 2, embriones degenerados y ovocitos no fecundados por cada protocolo aplicado, así por ejemplo, en el protocolo 1, a las 12 horas de retiro de CIDR, muestra 23 embriones de calidad 1, los que solo son embriones transferibles y utilizados en el presente trabajo, 1 embrión de calidad 2, 2 embriones degenerados y 5 óvulos no fecundados, todos ellos descartados, por otro lado en el protocolo 2, a las 24 horas del retiro del CIDR, se registra 50 embriones de calidad 1 en total, 4 embriones de calidad 2, 7 embriones degenerados y 10 óvulos sin fertilizar, así como en el protocolo 3, a las 36 horas del retiro del CIDR, se obtuvieron 31 embriones de calidad 1, 3 embriones de calidad 2, 3 embriones degenerados y 15 óvulos sin fertilizar. Al igual que en el primer protocolo, solo se trabajó con embriones de calidad 1, mientras que los demás se desechó, para el desarrollo de cada protocolo se utilizó 3 donadoras, empleados con 2 repeticiones, las mismas vacas donadoras se emplearon en el protocolo 2 y 3 con la misma cantidad de repeticiones.

Es evidente que en los tres protocolos aplicados se tiene una cantidad de óvulos no fecundados, y esto resalta en mayor cantidad en el protocolo P3 (Retiro del CIDR a las 36 horas) con 15 óvulos, seguido por el protocolo P2 (retiro del CIDR a las 24 horas) con 10 óvulos y el protocolo P1 (Retiro del CIDR a las 12 horas) con 5 óvulos. Pudieron deberse a

lo que menciona Bó *et al.* (1998), menciona, y estos factores atribuyen como el nivel nutricional, especie, edad, anestro lactacional.

Por otro lado pueda deberse a la distribución de las horas de inseminación, o el incremento de una dosis de semen a inseminar ya que se contara con mayor cantidad de óvulos, esto amerita seguir un estudio más para seguir mejorando la cantidad de embriones.

Tabla 18. Respuesta de los protocolos de superovulación, número de embriones obtenidos y datos transformados

N° Repeticiones	Protocolos	Cantidad de Embriones	Promedio por protocolo	N° Embriones datos transformados T
1	12 hrs.	23	3.8	2.23607
2				2.00000
3				2.23607
4				1.73205
5				1.41421
6				2.00000
7	24 hrs.	50	8.3	3.00000
8				3.00000
9				3.31662
10				3.00000
11				2.23607
12				2.64575
13	36 hrs.	31	5.1	2.23607
14				2.00000
15				2.64575
16				2.23607
17				2.23607
18				2.23607

Los resultados del presente estudio indican que la mejor respuesta de superovulación que se obtuvo frente a los protocolos aplicados fue el protocolo P2 (retiro del CIDR a las 24 horas), teniendo como resultado de 8.3 embriones viables de calidad 1, frente a la segunda mejor respuesta del protocolo P3 (Retiro del CIDR a las 36 horas), que se obtuvo de 5.1 embriones viables de calidad 1, mientras que con el protocolo P1 (Retiro del CIDR a las 12 horas), se obtuvo 3.8 embriones viables.

En un trabajo de investigación en Argentina, Becaluba (2012), incluyó 2048 recolecciones de embriones en donantes bovinas, se obtuvieron un promedio de 5.2 embriones transferibles por vaca, lo que es inferior a la respuesta que se obtuvo aplicando el protocolo P2 e igual al protocolo P3, pero si superior al protocolo P1.

Por otro lado Aspron (1992), menciona que se obtiene de 4 a 5 embriones transferibles por donadora superovulada. De manera que, después de mucho tiempo el promedio de colección de embriones transferibles o de calidad uno siguió siendo lo mismo, pero que en comparación a nuestro trabajo de la aplicación de los protocolos, el protocolo P2 (retiro del CIDR a las 24 horas) tiene alta significancia en la eficiencia de la producción de mayor cantidad y calidad de embriones transferibles, mas no con los protocolos P1 (Retiro del CID 12 horas) y P3 (Retiro del CIDR a las 36 horas).

Finalmente los protocolos utilizados para obtener los resultados que menciona Aspron (1992) y Becaluba (2012), son los mismos planteados por la IETS, sin embargo una modificación en el proceso del retiro del CIDR, (Progesterona), incrementa la cantidad de folículos reclutados, de manera que si le damos un poco más de tiempo en el proceso de la superovulación habrá más cantidad de folículos acumulados y reclutados, en consecuencia se tendrá mayor cantidad de óvulos = embriones, lo que fue la hipótesis del trabajo, sin embargo, en un protocolo donde se retira el CIDR a 36 horas baja la cantidad de embriones pero al mismo tiempo incremento la cantidad de óvulos no fecundados.

El obtener la mayor cantidad de embriones con uno de los protocolo definitivamente se hará mucho más rentable y eficiente la aplicación de la tecnología de la producción y transferencia de embriones en vivo, de manera que esta investigación en cuanto a los resultados se tenga que plasmar en un trabajo de masificación.

4.1.1 Prueba de comparación múltiple Duncan ($Pr < 0.05$) para estimar la mejor hora de retiro de CIDR y mayor cantidad de embriones

Con la prueba de significancia de Duncan ($Pr < 0.05$) se determinó que el protocolo P2 (24 horas retirado CIDR) tuvo el mejor resultado en la superovulación y cuya eficiencia se representa en un mayor número de embriones con un promedio de 2.86 embriones estos son respuestas con datos transformados raíz cuadrada de x seguido por el protocolo P3 (a las 36 horas de retiro del CIDR), con un promedio de 2.26 embriones existiendo diferencias significativas estadísticas entre estos protocolos , al final tenemos al protocolo P1 (a las 12 horas de retiro del CIDR) con un promedio de 1.93 embriones

Tabla 19. Análisis de varianza para estimar la mejor hora de retiro del dispositivo CIDR

Fuente	G.L	S.C	C.M	Fc	Sig.
Protocolos	2	2.66916035	1.33458017	14.07	(**)
Error exp.	15	1.42292733	0.09486182		
Total	17	4.09208768			

C.V.= 13.07320%

 $F_{0.05}(2,15)=3.68$ $F_{0.01}(2,15)=6.36$ **Tabla 20.** Prueba de Duncan al 95% para estimar la mejor hora de retiro de CIDR aplicando los tres protocolos

Protocolos	Tratamientos	Valores	Significancia
P3 – 24 hrs.	6	2.8664	A
P3 – 36 hrs.	6	2.2650	B
P1 – 16 hrs.	6	1.9364	B

Palomino (2000), menciona que las hembras nacen con una gran reserva de folículos primarios que encierran los oocitos, a partir de la pubertad los folículos van a dejar el estado de reserva para comenzar a crecer de forma diferente, llegando algunos a su culminación y la mayor parte degenerando. Estas mismas se manifiestan a través de ondas foliculares así como describe Bó *et al.* (1998), una onda folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos, caracterizada por el desarrollo de un gran folículo dominante, el cual es anovulatorio si ocurre durante la fase luteal y ovulatorio si ocurre en la fase folicular; y varios folículos que invariablemente se atresian.

Así como estos ocurre de manera natural en la vaca, en el proceso del trabajo de investigación se modificó estas ondas foliculares con mayor cantidad de FSH y mayor tiempo de permanencia de la Progesterona - CIDR (Bó *et al.*, 1998), la función específica de la FSH y LH es estimular el crecimiento de los folículos, donde en una etapa ocurre el reclutamiento y selección natural de una determinada cantidad de folículo (1 y 2).

Para el proceso de la superovulación durante la ejecución del trabajo de investigación se aplicó dos dosis de PGF2 α y estas puedan cumplir con la ruptura de la mayor cantidad de los folículos superovulados, Palomino (2000), menciona que, el aumento de los niveles de PGF2 α , posteriormente las contracciones ováricas provocadas por la PGF2 α producen la ruptura del folículo, el cual se contrae por la misma PGF2 α e impulsa el ovocito. Después de la descarga preovulatoria, no se detectan pulsos de

LH durante 6-12 horas, 10 que refleja el agotamiento del contenido hipofisiario de esta hormona.

4.2 Porcentaje de preñez en receptoras de embriones transferidas a tiempo fijo

Se ha desarrollado el mismo protocolo de sincronización para inseminación a tiempo fijo, así como se muestra en la tabla 21. Las receptoras de embriones mostraron en su totalidad los signos de estro o celo.

Luego de 7 días de que las vacas receptoras hayan entrado en celo, se revisó a través de la palpación rectal los ovarios de las receptoras, en los cuales se evaluó el nivel del cuerpo lúteo, seleccionando solo las receptoras que tuvieron respuestas de cuerpos lúteos de grado 1 y 2, descartando las receptoras que presentaban cuerpos lúteos menos desarrollados y con presencia de folículos.

A los 14 días de haber transferidos los embriones a las receptoras, se registraron las vacas receptoras que mostraron celo y las receptoras que no mostraron, para luego a los 35 días de transferido el embrión mediante la palpación rectal se revisó la gestación de las mismas, certificando así en 15 a 20 días más la preñez de las receptoras. De manera que los resultados fueron de la siguiente manera.

Tabla 21. Porcentaje de preñez de vacas receptoras transferidas de embriones.

Protocolos	Vacas Transferidas	Vacas Preñadas	Preñez %
P1 = 12 hrs.	17	11	64.71
P2 = 24 hrs.	19	12	63.16
P3 = 36 hrs.	11	7	63.64
Total	47	30	63.83

Tal como se muestra en la figura 12, la cantidad de vacas receptoras que se transfirieron con embriones y la cantidad de vacas gestantes, no se incluye vacas con abortos a los 60 días ni las receptoras que tuvieron muertes embrionarias que fueron mínimas. En total 47 vacas receptoras transferidas con embrión congelado, de las cuales 30 vacas receptoras preñadas certificadas, lo que repercute en el porcentaje de preñez de 63.83%.

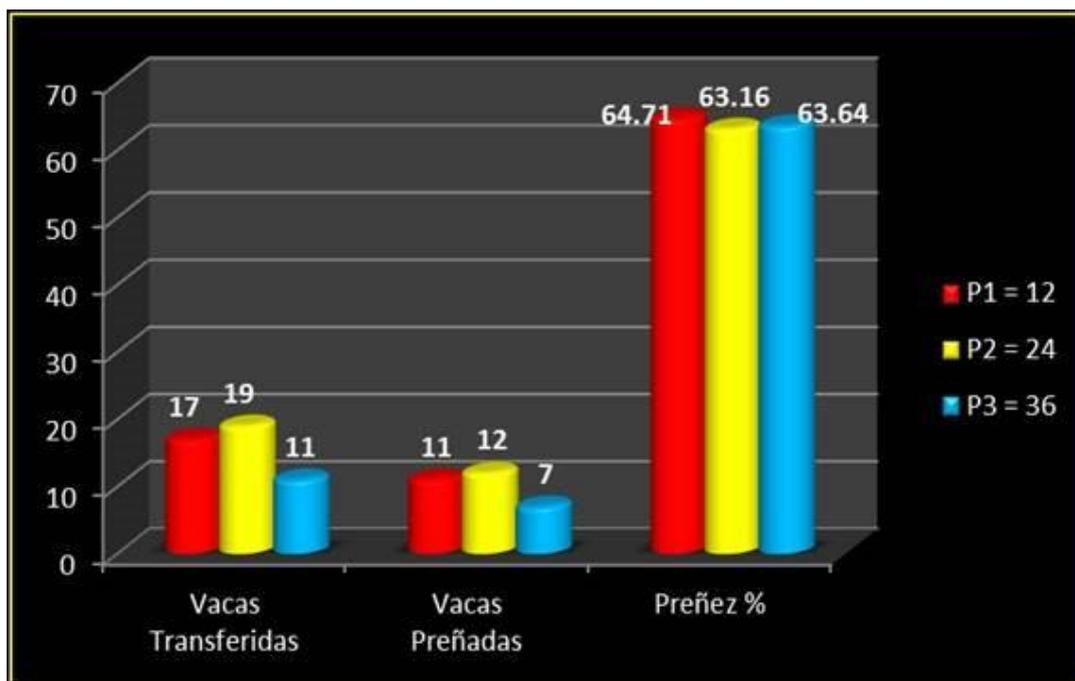


Figura 12: Porcentaje de preñez de vacas receptoras transferidas de embriones.

En promedio se obtuvo el 63.83% de gestación, Aspróm (1992), obtuvo el 50% de gestación con embriones frescos y congelados, mientras que Becaluba (2012), de 254 vacas transferidas registra 48.4% de preñez, por otro lado, De Luca *et al.* (2006), de 111 vacas transferidas obtuvo el 50.45% de gestación.

4.3 Costo de producción y de transferencia de embriones por protocolo

Bajo las condiciones del presente estudio, se obtuvieron los resultados siguientes de los costos de producción y de transferencia de embriones por cada protocolo en Puno, en función a los parámetros evaluados. Los costos variables y los costos fijos, así como los costos totales protocolo se precisan en la tabla 22, detallados por rubros en soles y dólares americanos y su constitución en términos porcentuales.

Tabla 22. Costos de producción de embriones transferibles por protocolo

MATERIALES, MEDIOS Y EQUIPOS	COSTO POR PROTOCOLO (P)								
	P1 (Retiro del CIDR a 12 hrs)			P2 (Retiro del CIDR a 24 hrs)			P3 (Retiro del CIDR a 36 hrs)		
	S/.	\$	%	S/.	\$	%	S/.	\$	%
I. Costos variables	11,227.50	3,341.52	88.08	11,482.30	3,417.35	88.31	11,324.10	3,370.27	88.17
a. Materiales de laboratorio	1,664.00	495.24	13.05	1,927.80	573.75	14.83	1,769.60	526.67	13.78
Manguera colectora + filtro	840.00	250.00	6.59	840.00	250.00	6.46	840.00	250.00	6.54
Pajillas 1/4 - gama irradiate DT	155.00	46.13	1.22	341.00	101.49	2.62	217.00	64.58	1.69
Jeringas de 20 ml	115.20	34.29	0.90	115.20	34.29	0.89	115.20	34.29	0.90
Placa petri cuadrada	112.00	33.33	0.88	112.00	33.33	0.86	112.00	33.33	0.87
Jeringas de 10 ml	92.40	27.50	0.72	92.40	27.50	0.71	92.40	27.50	0.72
Acrodiscos milipore	84.00	25.00	0.66	84.00	25.00	0.65	84.00	25.00	0.65
Placa petri redonda	63.00	18.75	0.49	63.00	18.75	0.48	63.00	18.75	0.49
Tapón de pajuelas con adaptador de 1/4 a 1/2	30.00	8.93	0.24	66.00	19.64	0.51	42.00	12.50	0.33
Pajillas 1/4 - gama irradiate	24.00	7.14	0.19	48.00	14.29	0.37	48.00	14.29	0.37
Punta de Micropipetas Aguja 21 - 1*1/2	33.00	9.82	0.26	43.00	12.80	0.33	38.00	11.31	0.30
Camisa Sanitaria	23.40	6.96	0.18	23.40	6.96	0.18	23.40	6.96	0.18
Guantes obstétrico (100/caja)	23.40	6.96	0.18	23.40	6.96	0.18	23.40	6.96	0.18
Jeringas de 05 ml	23.10	6.88	0.18	23.10	6.88	0.18	23.10	6.88	0.18
Agujas 22 - 1*1/2	15.60	4.64	0.12	15.60	4.64	0.12	15.60	4.64	0.12
Pipetas de plástico	14.40	4.29	0.11	14.40	4.29	0.11	14.40	4.29	0.11
Pajuelas 1/2 pkt 5	6.50	1.93	0.05	14.30	4.26	0.11	9.10	2.71	0.07
Funda de Inseminación	9.00	2.68	0.07	9.00	2.68	0.07	9.00	2.68	0.07
b. Medios hormonales	5,654.00	1,682.74	44.35	5,654.00	1,682.74	43.48	5,654.00	1,682.74	44.02
Foltropin FSH 20ml	4,800.00	1,428.57	37.65	4,800.00	1,428.57	36.92	4,800.00	1,428.57	37.37
CIDR pkt/10	450.00	133.93	3.53	450.00	133.93	3.46	450.00	133.93	3.50
Lutalise LH 30ml	294.00	87.50	2.31	294.00	87.50	2.26	294.00	87.50	2.29
Hormona GnRH 10ml	96.00	28.57	0.75	96.00	28.57	0.74	96.00	28.57	0.75
Benzoato de estradiol 10ml	14.00	4.17	0.11	14.00	4.17	0.11	14.00	4.17	0.11
c. Medios de laboratorio	3,909.50	1,163.54	30.67	3,900.50	1,160.86	30.00	3,900.50	1,160.86	30.37
Pajuelas con semen congelado	1,440.00	428.57	11.30	1,440.00	428.57	11.07	1,440.00	428.57	11.21
Complete flush	1,430.00	425.60	11.22	1,430.00	425.60	11.00	1,430.00	425.60	11.13
Medio de mantenimiento	336.00	100.00	2.64	360.00	107.14	2.77	360.00	107.14	2.80
Medio de congelación de embrión	145.00	43.15	1.14	112.00	33.33	0.86	112.00	33.33	0.87
Nitrógeno Líquido	96.00	28.57	0.75	96.00	28.57	0.74	96.00	28.57	0.75
Selenio inyetable 250ml	90.00	26.79	0.71	90.00	26.79	0.69	90.00	26.79	0.70
Oxitetraciclina 250	88.00	26.19	0.69	88.00	26.19	0.68	88.00	26.19	0.69
Fosforo inyetable 250ml	85.00	25.30	0.67	85.00	25.30	0.65	85.00	25.30	0.66
Alcohol 70°	36.00	10.71	0.28	36.00	10.71	0.28	36.00	10.71	0.28
Yodo	36.00	10.71	0.28	36.00	10.71	0.28	36.00	10.71	0.28
Algodón	33.00	9.82	0.26	33.00	9.82	0.25	33.00	9.82	0.26
Lidocaina al 2% frasco/20 ml	30.00	8.93	0.24	30.00	8.93	0.23	30.00	8.93	0.23
Vitamina ade 50ml	28.00	8.33	0.22	28.00	8.33	0.22	28.00	8.33	0.22
Gel lubricante	22.50	6.70	0.18	22.50	6.70	0.17	22.50	6.70	0.18
Papel toalla	14.00	4.17	0.11	14.00	4.17	0.11	14.00	4.17	0.11
2. Costos fijos	1,520.00	452.38	11.92	1,520.00	452.38	11.69	1,520.00	452.38	11.83
a. Servicio personal especializado en transferencia	800.00	238.10	6.28	800.00	238.10	6.15	800.00	238.10	6.23
b. Alquiler de equipos de laboratorio	600.00	178.57	4.71	600.00	178.57	4.61	600.00	178.57	4.67
c. Transporte de equipo de transferencia	120.00	35.71	0.94	120.00	35.71	0.92	120.00	35.71	0.93
1 + 2 = COSTO TOTAL (S/.)	12,747.50	3,793.90	100.00	13,002.30	3,869.73	100.00	12,844.10	3,822.65	100.00

4.3.1 Costo de producción de embriones

4.3.1.1. Costos variables

Los costos variables (Tabla 23) de los protocolos evaluados (Protocolo: P1, Protocolo 2: P2 y Protocolo 3: P3) para transferencia de embriones en vacunos del CIP Illpa UNA Puno, representan el 88.08, 88.31 y 88.17% de manera respectiva. En orden de importancia los costos variables de medios hormonales representan el 44.35, 43.48 y 44.02%, seguidos de los costos variables de medios de laboratorio que constituyen 30.67, 30.00 y 30.37%, siendo los costos variables de materiales de laboratorio 13.05, 14.03 y 13.78%, respectivamente.

Tabla 23. Costos variables de producción de embriones viables por protocolo

FUENTE DE COSTOS VARIABLES	COSTO VARIABLE POR PROTOCOLO (P)					
	P1 (Retiro del CIDR a las 12 hrs)		P2 (Retiro del CIDR a las 24 hrs)		P3 (Retiro del CIDR a las 36 hrs)	
	S/.	\$	S/.	\$	S/.	\$
Costo variable por unidad animal y por embrión						
Número de donadoras sometidas a superovulación	3.00		3.00		3.00	
Número total de lavados realizados	6.00		6.00		6.00	
Número total de embriones viables logrados	23.00		50.00		31.00	
Número total de receptoras	17.00		19.00		11.00	
Número promedio de embriones por lavado	3.83		8.33		5.17	
Costo total por vacas superovuladas y colectadas	11,227.50	3,341.52	11,482.30	3,417.35	11,324.10	3,370.27
Costo por vaca superovulada y colectada	1,871.25	556.92	1,913.72	569.56	1,887.35	561.71
Costo de producción por embrión	488.15	145.28	229.65	68.35	365.29	108.72
Costo por embrión más 50% de fracaso	732.23	217.93	344.47	102.52	547.94	163.08

Según el análisis de los costos variables en promedio de los tres protocolos, demuestra que en los costos de medios hormonales el mayor porcentaje está representado por la hormona Folltropin FSH de 20ml, seguidos de CIDR pkt/10 y Lutalise LH de 30ml, los mismos que constituyen el 37.31, 3.50 y 2.29%, respectivamente. Dentro de los costos variables de medios de laboratorio, los principales costos están constituidos por pajuelas con semen congelado (11.19%), Complete Plush (11.12%) y medio de mantenimiento (2.74%); mientras que, los principales costos de materiales de laboratorio están compuestos por manguera colectora más filtro y pajillas ¼ - gama irradiate DT con 6.53 y 1.85%, de manera respectiva.

El costo variable por unidad animal y por embrión transferible obtenido es de \$ 145.28 (S/. 488.15) para el P1; \$ 68.35 (S/. 229.65) y \$ 108.72 (S/. 365.29) para los P2 y P3 respectivamente, asumiendo que los embriones transferidos tuvieran una tasa de gestación del 100%. Estos valores ascendieron a \$ 217.93 (S/. 732.23); \$ 102.52 (S/. 344.47) y \$ 163.08 (S/. 547.94) para los protocolos P1, P2 y P3 correspondientemente, cuando se incluyó el costo de la ineficiencia del 50% de

embriones transferidos que no llegan a preñar (Tabla 23).

Estos costos (145.28, 68.35 y 108.72 dólares por embrión transferible) son superiores a los reportados por Escobar (2012) en Caldas – Antioquia; Bolívar *et al.* (2008), así como de Bolívar y Maldonado (2008) en Colombia, quienes asignan valores de USA \$ 102.0, 72.7 y 63.40 a los costos variables; del mismo modo, son altamente superiores a los reportes de Pereyra (2014), quien reporta valores de costos variables por embrión transferible de \$ 48.39 para el P1; \$ 46,37 y \$ 29,07 para los P2 y P3 respectivamente. La variación de costos puede deberse al valor de las hormonas y al tipo de cambio de los dólares americanos entre países.

4.3.1.2. Costos fijos

En la tabla 24, se muestran los costos fijos de producción de los tres protocolos en estudio para transferencia de embriones en vacunos del CIP Illpa – UNA Puno, el cual se obtuvo de los valores de servicio de personal especializado en transferencia de embriones (6.28, 6.15 y 6.23%), alquiler de equipos de laboratorio (4.71, 4.61 y 4.67%) y transporte de equipo de transferencia (0.94, 0.92 y 0.93%), respectivamente. La sumatoria de estos costos dio valores de USA \$ 452.38 para los tres protocolos, los mismos que representan el 11.92, 11.69 y 11.83% para los protocolos P1, P2 y P3 de manera respectiva.

Tabla 24. Costos fijos de producción de embriones viables por protocolo

FUENTE DE COSTOS FIJOS	COSTO FIJO POR PROTOCOLO (P)					
	P1 (Retiro del CIDR a las		P2 (Retiro del CIDR a las		P3 (Retiro del CIDR a las	
Costo fijo por unidad animal y por embrión	S/.	\$	S/.	\$	S/.	\$
Número de donadoras sometidas a superovulación	3.00		3.00		3.00	
Número total de lavados realizados	6.00		6.00		6.00	
Número total de embriones viables logrados	23.00		50.00		31.00	
Número total de receptoras	17.00		19.00		11.00	
Número promedio de embriones por lavado	3.83		8.33		5.17	
Costo total por vacas superovuladas y colectadas	1,520.00	452.38	1,520.00	452.38	1,520.00	452.38
Costo por vaca superovulada y colectada	253.33	75.40	253.33	75.40	253.33	75.40
Costo de producción por embrión	66.09	19.67	30.40	9.05	49.03	14.59
Costo por embrión más 50% de fracaso	99.13	29.50	45.60	13.57	73.55	21.89

Los costos fijos de producción por embrión transferible obtenidos fueron para el Protocolo 1: \$ 19.67 (S/. 66.09), \$ 9.05 (S/. 30.40) y \$ 14.59 (S/. 49.03) para los P2 y P3 respectivamente, asumiendo que los embriones transferidos tuvieran una tasa de gestación del 100%. Estos resultados pueden variar a \$ 29.50 (S/. 99.13) para P1; \$ 13.57 (S/. 45.60) para P2 y \$ 21.89 (S/. 73.55) para P3, cuando se incluyó el costo de la ineficiencia del 50% de embriones transferidos que no llegan a preñar (Tabla 7).

Los valores encontrados son inferiores a los mencionados por Escobar (2012) en Caldas – Antioquia, Bolívar *et al.* (2008), así como de Bolívar y Maldonado (2008) en Colombia, quienes reportaron costos fijos de \$ 138.3, 83.8 y 51.7 para los protocolos 1, 2 y 3, respectivamente en transferencia de embriones; asimismo, son inferiores a los reportes de Pereyra (2014), quien encontró valores de USA \$ 110.70, 103.80 y 67.71 para P1, P2 y P3 respectivamente, costos que aumentan si estos no son transferidos en fresco. Estos resultados se deben posiblemente al tipo de cambio de la moneda extranjera y las variaciones en el mercado de los equipos, instrumentos e insumos de laboratorio.

4.3.1.3. Costos totales

Los costos totales de producción (costos variables y costos fijos) por protocolo, se detallan en el Cuadro 25, donde se señala que los costos variables representan un 88.08, 88.31 y 88.17% para los protocolos P1, P2 y P3 respectivamente, con un promedio global de 88.18%; mientras, que los costos fijos constituyen un 11.82% en promedio, siendo de 11.92, 11.69 y 11.83% para los protocolos P1, P2 y P3 respectivamente.

Tabla 25. Costos totales de producción de embriones viables por protocolo

FUENTE DE COSTOS TOTALES	COSTO TOTAL POR PROTOCOLO (P)					
	P1 (Retiro del CIDR a las		P2 (Retiro del CIDR a las		P3 (Retiro del CIDR a las	
Costo total por unidad animal y por embrión	S/.	\$	S/.	\$	S/.	\$
Número de donadoras sometidas a superovulación	3.00		3.00		3.00	
Número total de lavados realizados	6.00		6.00		6.00	
Número total de embriones viables logrados	23.00		50.00		31.00	
Número total de receptoras	17.00		19.00		11.00	
Número promedio de embriones por lavado	3.83		8.33		5.17	
Costo total por vacas superovuladas y colectadas	12,747.50	3,793.90	13,002.30	3,869.73	12,844.10	3,822.65
Costo por vaca superovulada y colectada	2,124.58	632.32	2,167.05	644.96	2,140.68	637.11
Costo de producción por embrión	554.24	164.95	260.05	77.39	414.33	123.31
Costo por embrión más 50% de fracaso	831.36	247.43	390.07	116.09	621.49	184.97

En la tabla 25, se muestra los costos totales empleados en el desarrollo de todo el protocolo en las tres vacas donadoras, cada una con 2 repeticiones, lo que significa que se ha desarrollado 6 superovulaciones en total y cada uno de los trabajos en promedio bordea alrededor de los S/. 2,200.00, cuyo monto dividido por la cantidad de embriones totales transferibles obtenidos, arroja el costo total por embrión y por protocolo desarrollado.

Estos costos totales de producción por embrión transferible obtenidos fueron para el Protocolo 1: \$ 164.95 (S/. 554.24), \$ 77.39 (S/. 260.05) y \$ 123.31 (S/. 414.33) para los P2 y P3 respectivamente, asumiendo que los embriones transferidos tuvieran una tasa de gestación del 100%. Estos valores ascendieron a \$ 247.43 (S/.

831.36); \$ 116.09 (S/. 390.07) y \$ 184.97 (S/. 621.49) para los protocolos P1, P2 y P3 correspondientemente, cuando se incluyó el costo de la ineficiencia del 50% de embriones transferidos que no llegan a preñar (Tabla 7). Estos valores son superiores a los reportados por Boli var *et al.* (2008); Escobar (2012) en Caldas – Antioquia; y Pereyra (2014).

La variación del costo de producción de embriones, se debe a muchos factores, principalmente a la disponibilidad de materiales e insumos que pudieran existir en nuestro país, ya que la mayoría de los insumos, materiales y equipos son importados, otro de los factores son el tipo de cambio de la moneda internacional, como en este estudio el tipo de cambio considerado es de S/. 3.36 por \$ 1.00. También se debe fundamentalmente a la cantidad de embriones obtenidos por protocolo.

Se observa que al igual que en la transferencia de embriones en ovinos, en vacunos los factores que afectan los costos de producción de embriones son la cantidad de receptoras que deben estar disponibles el día de la transferencia, además de los resultados técnicos en términos de cantidad de embriones transferibles por lavado y los porcentajes de gestación de los embriones transferidos, las tasas de aborto y las pérdidas perinatales por distocia.

Entre los mayores costos para el productor está el mantenimiento de las receptoras hasta que se logre la gestación, ya sea por los cuidados sanitarios y de manejo que estas reciben, tal como lo corrobora Leoney *et al.* (2006), quien indica que el mayor costo económico de la transferencia de embriones está representado en la necesidad de mantener las hembras receptoras, debido a los costos de la alimentación, la sincronización y la transferencia no exitosa.

Los resultados obtenidos sugieren que hay diferencias importantes en la manipulación hormonal de las donadoras con los tres protocolos evaluados, debido a que la sincronización de la receptora en el P2 parece requerir más manipulación y con mejores resultados. El hecho de que el P2 presentó los menores costos de producción por embrión transferible producido es debido a su mayor obtención de embriones por lavado, este resultado quizás motive aún más a los ganaderos y empresarios a su utilización.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio y por los diferentes autores sobre los costos de producción de transferencia de embriones, pareciera ser muy costosa en comparación a la inseminación artificial, ya que se tiene menor porcentaje de preñez efectiva, menor cantidad de embriones viables y pocos profesionales

calificados, por lo que en nuestro país y otros con bajos recursos económicos aún no se desarrolla dicha tecnología; no obstante, el beneficio económico es mayor, ya que el avance acelerado en el proceso de la biotecnologías reproductivas genera un aumento significativo de la productividad lechera y cárnica en ganado vacuno y se acorta sobre todo el tiempo de la mejora genética (9 meses) a comparación de otras tecnologías reproductivas así como la inseminación artificial (más 10 años), generando mayores ingresos económicos al productor en muy corto tiempo.

4.3.2 Costo de transferencia de embriones

El resultado del costo de transferencia de embriones a una va ca receptora se muestra en la tabla 26. Este resultado, también puede ser variable según el tipo de cambio del dólar así como la disponibilidad de materiales e insumos necesarios para transferir embriones.

Tabla 26. Costo general de transferencia de un embrión a una receptora

RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	COSTOS	SUB TOTAL
Materiales e insumos para transferencia de embrión	Global	1	36.50	36.50
Alquiler de equipos	Global	1	10.00	10.00
Servicio especialista	Global	1	50.00	50.00
Total				96.50

En la tabla 27, se muestra el costo total de transferencia de un embrión a una vaca receptora, que en suma asciende a S/. 96.50, distribuidos en materiales e insumos empleados para transferencia de embriones (S/. 36.50); del mismo modo, incluye el costo del alquiler de los equipos (S/. 10.00) y además el costo del servicio del especialista transferensista (S/. 50.00). Este último puede ser variable según el caso y o técnico que desarrolle el trabajo; sin embargo, para efectos del presente estudio se ha costeado un costo mínimo promedio existente en el mercado.

Tabla 27 . Costo detallado de transferencia de un embrión a una receptora.

RUBROS	U.M.	Cantidad	Costo	Sub Total	Total
Materiales e Insumos para transferencia de embrión					36.50
Funda de transferencia	Unidad	1	16.80	16.80	
Papel Toalla	Unidad	1	1.00	1.00	
Algodón	Kilos	0.1	22.00	2.20	
Jeringa 10ml	Unidad	1	2.20	2.20	
Lidocaina 20ml	Frasco	0.5	15.00	7.50	
Alcohol	Litros	0.2	9.00	1.80	
Camisa Sanitaria	Unidad	1	1.20	1.20	
Yodo	Litros	0.05	36.00	1.80	
Guantes Oblétricos	Unidad	2	1.00	2.00	
Alquiler de Equipos	Global	1	10.00	10.00	10.00
Servicio Especialista	Global	1	50.00	50.00	50.00
TOTAL					96.50

Según el análisis de los costos de materiales e insumos para transferencia de embrión a las vacas receptoras, los costos de mayor importancia estas constituidos por funda de transparencia (S/. 16.80), lidocaína al 2% (S/. 7.50), algodón y jeringa de 10 ml (ambos con un costo de S/. 2.20) y guantes obstétricos (S/. 2.00). Los demás materiales e insumos para transferencia de embriones, representan un menor porcentaje y poco significativo en términos económicos.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se llega a las siguientes conclusiones:

- a. El protocolo P2, con 24 horas de retiro del CIDR luego de la primera dosis de aplicación de la prostaglandina, tuvo la mejor respuesta en el proceso superovulatorio con 8.33 embriones viables y transferibles en promedio, seguida del protocolo P3 de 36 horas de retiro de CIDR con 5.17 embriones viables y finalmente el protocolo P1 de 12 horas de retiro del CIDR con 3.83 embriones transferibles.
- b. El porcentaje de preñez obtenido en promedio es de 63.83%, siendo la tasa de preñez 64.71, 63.16 y 63.64% para los protocolos P1, P2 y P3 con retiro del CIDR a las 12, 24 y 36 horas, respectivamente.
- c. Los costos totales de producción del embrión obtenido con la aplicación de los diferentes protocolos están directamente relacionados con la cantidad de embriones viables de la calidad uno, siendo estas de S/. 554.24 (\$ 164.95), S/. 260.05 (\$77.39) y S/. 414.33 (\$ 123.31) por embrión, para los protocolos P1, P2 y P3 con retiro del CIDR a las 12, 24 y 36 horas, respectivamente.

RECOMENDACIONES

En base a las conclusiones arribadas, se recomienda lo siguiente:

- a. Utilizar el protocolo dos (2), donde contempla y la variante es el retiro del CIDR a las 24 horas luego de la aplicación de la prostaglandina, ya que se obtendrá mayores cantidades embriones viables de la calidad uno.
- b. En el proceso de la transferencia de embriones, se recomienda emplear el protocolo planteado en el trabajo que es el protocolo de sincronización de estro para la transferencia de embriones a tiempo fijo TETF, además el costo del mismo es mínimo y tienen a ser más eficiente en cuanto a las vacas preñadas por transferencia de embriones.
- c. Por otro lado el costo de producción de embrión es más económico cuando existe mayor cantidad de embriones producidos por la vaca donadora, es por ello que se hace énfasis en la aplicación del protocolo que mayor cantidad de embriones con que se produjo.
- d. Finalmente, la tecnología de la transferencia de embriones viene desarrollándose cada año con más resalte en su técnica, los ganaderos pueden tener acceso a esta tecnología a costos más económicos de manera que pueda ser más rentable desarrollar esta tecnología en sus hatos ganaderos. No es una herramienta de mejoramiento genético pero si una herramienta que puede ayudarnos a masificar la genética que se ha desarrollado durante muchos años, acortando tiempo y lógicamente la inversión que este puede tener.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aller, J. E.; Albeiro, R. y Palma, G. A. (2000). *Gestación con Embriones producidos in vivo a partir de Ovocitos Recuperados de Vacas Ovariectomizadas*. Revista Científica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce, Argentina. Vol. 06, N° 07, p. 08 14.
2. Albarracin, J. L. (1998). *Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en vacas gir, con GnRH, PGF2α y Estrógeno*. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - U.A.G.R.M. Santa Cruz - Bolivia. pp. 3-4, 48-51.
3. Asprón, M. A. (1992). *Transferencia de Embriones Bovinos - Biotecnología de Punta*. Revista Científica Técnica. Organización Mundial de Sanidad Animal. Vol. 08, N° 02, p. 13, 18 21.
4. Baruselli, P. S.; Sá Philo, M.; Matins, C. M.; Naser, L. F.; Nogueira, M. F. G.; Barros, C. M. and Bó, G. A. (2006). *Superovulation and embryo transfer in Bos Indicus cattle*. Theriogenology 65, 77-88.
5. Becaluba, F. (2012). *Factores que Afectan la Superovulación en Bovinos*. Revista Científica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce, Argentina. Vol. 17, N° 06, p. 09, 113 115.
6. Bó, G. A. y Mapletoft, R. J. (1999). *Effect of Progesterone and Estrogen in Cows*. Theriogenology. 49:13251531.
7. Bó, G. A.; Adams, G. P.; Caccia, M.; Martinez, M.; Person, R. A., and Mapletoft, R. J. (1995). *Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle*. Anim. Reprod. Sci. 39, 193-204.
8. Bó, G. A.; Baruselli, P. S.; Moreno, D.; Cutaia, L.; Caccia, M.; Tríbulo, R.; Tríbulo, H. and Mapletoft, R. J. (2002). *The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle*. Theriogenology, 57: 53-72.
9. Bó, G. A.; Baruselli, P. S.; Chesta, P. and Martins, C. M. (2006). *The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle*. Theriogenology. 65: 89-101.
10. Bó, G. and Caccia, M. (1996). *Segundo Simposio Internacional de reproducción Animal de Córdoba (IRAC)*. Córdoba - Argentina, p. 61-109.

11. Bó, G. y Caccia, M. (1998). *Actualización en Fisiología de la Reproducción de la vaca. Curso de Post - Grado*. En Reproducción Bovina. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (IRAC). Córdoba -Argentina, p. 1- 87.
12. Bolivar, P. A. y Maldonado, J. G. (2012). *Análisis de costos de esquemas de transferencia de embriones, utilizados en Colombia*. Universidad de Antioquia. Revista colombiana de Ciencias Pecuarias.
13. Bueno, L. A. (2012). *Reproducción Animal*. Guía de enseñanza universitaria UNA Puno Perú.
14. Compendio Estadístico (2010). *Dirección regional agraria Puno*.
15. Cutini, A. y Teruel, M. J. (2000). *Factores que Determinan el Resultado de la Transferencia no Quirúrgica de Embriones Bovinos*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de León - España.
16. De Bem, M. (1994). *Técnica de la Transferencia de Embriones*. Revista Científica de la Universidad Austral de Chile. Vol.03, N° 06, p.12 19.
17. Di-Bella V. (2009). *Manual de inseminación artificial y transferencia de embriones en bovinos*. Empresa Reproducción y Clínica de Bovinos. Tampico Tam. México.
18. De Luca, C. (2006). *Niveles Plasmáticos de Progesterona en Receptoras de Embriones Congelados, Determinados por Elisa -Test*. Revista Científica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce, Argentina. Vol. 15, N° 14, p. 13 21.
19. De Sandro, S. (2005). *Tasa de Gestación en Hembras Bovino Después de la Transferencia de Embriones Frescos y Embriones Congelados Producidos in vivo*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de León - España.
20. Duterte, N. O. (2008). *Transferencia de Embriones de Bovinos - Impactos*. Ediciones Mundi - Prensa. España. 110 p.
21. Escobar, P. P. (2012). *Evaluación de costos de producción en el proceso de transferencia de embriones y fecundación in vitro*. Caldas – Antioquia.
22. Forlino, M. A. (2005). *Transferencia Embrionaria en Bovinos*. Revista Científica Técnica: Organización Mundial de Sanidad Animal. Vol. 31, N° 37, p.13 18.

23. Gasque, G. R. (2008). *Enciclopedia Bovina*. Primera edición. México.
24. Hafez, E. S. E. (1996). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. México. D. F. Sexta Edición. Interamericana. p. 1 - 523.
25. Henríquez, M. M. (1998). *Mejoramiento Genético Mediante Transplante de Embriones*. Revista Científica Técnica. El Rancho. N° 57. p.22 34.
26. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 2a ed. IETS. Champaign, Illinois. Estados Unidos de América (2004).
27. Manual of the International Embryo Transfer Association (IETA). 1a ed. IETA. Champaign, Illinois. Estados Unidos de América, 86 p.
28. McDonald, L. E. (1971). *Reproducción y Endocrinología Veterinaria*. Traducido de la Primera Edición por LOLEEHERO, A. México D. F. Interamericana. p. 150- 153, 226.
29. Pereyra, A. (2014). *Determinación de costos en la transferencia de embriones de ganado vacuno en Yurimaguas*. Tesis de grado. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Yurimaguas, Loreto.
30. Palomino, M. H. (2000). *Biología del Trasplante y Micro Manipulación de Embriones de Bovinos y Camélidos de los Andes*. A.F.A. Editores Importadores S.A. Perú.
31. Select Sires Reproduction (2008). *Manual de Inseminación Artificial en Bovinos*. Dr. Ray Nebel, Especialista en Reproducción.
32. Salisbury, G. W. y Vandemark, N. (1964). *Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bovinos*. Traducido por Louque, J. M. Zaragoza - España. Editorial Acribia. pp. 30-140.
33. Thompson, R. (2005). *Transferencia de Embriones - Biología de Punta*. Recientes Avances en el Desarrollo de Sistemas de Cultivos Definidos. Instituto de Reproducción Animal. Córdoba. Argentina. 196p.
34. Walenciak, D. (2005). *Superovulación Versus Alimentación en los Bovinos*. Revista Científica Genes. México. p. 13 15.
35. Zapien, S. A. (1990). *Transferencia de Embriones - Uso e Impacto en la Ganadería de Leche*. Editorial Ariel. Madrid - España. 236 p.

Webgrafía

- Alberti, A. (2006). *Valoración de embriones de bovinos*. Disponible en <http://www.munar.com.ar/transemb.htm>. [Accesado el 8 de junio de 2015]
- Bolivar, P. (2008). *Análisis de costos de esquemas de transferencia de embriones bovinos utilizados en Colombia*. En: Revista Colombiana de ciencias pecuarias. Disponible en http://www.cundinamarca.gov.co/Cundinamarca/Archivos/FILE_ENTIDADES/FILE_ENTIDADES55033.pdf>. [Accesado el 28 de junio de 2016]
- Jonathan, C. (2008). *Donadoras de embriones en tratamiento*. Disponible en <http://www.incagro.gob.pe/blog/?p=33> [Accesado el 2 de agosto de 2016].
- Luna, E. (2006). *Uso de las hormonas gonadotrofinas*. Disponible en <http://www.intervet.com>. [Accesado el 11 de enero de 2017].
- Looney, C. R. (2006). *Superovulation in beef females*. In: Proc 5th Annual Convention AETA, Fort Worth, Texas: 16-29. [Accesado el 28 de junio de 2016].

ANEXOS

Anexo 1. Panel fotográfico



Foto 1. Vacas receptoras de embriones en el CIP Illpa UNAP



Foto 2. Registro de vacas receptoras de embriones en el CIP Illpa UNAP



Foto 3. Vaca donadora de embrión (Camelia) - CIP Illpa UNAP



Foto 4. Vaca donadora de embrión (Tornina)



Foto 5. Diagnóstico de vaca receptora de embriones



Foto 6. Revisión de estro en vacas receptoras de embriones



Foto 7. Preparación de materiales para la sincronización de receptoras



Foto 8. Medios hormonales para la sincronización de estro



Foto 9. Materiales y medios hormonales para la superovulación



Foto 10. Evaluación ovárica a donadora de embrión.



Foto 11. Preparación de donadora para inseminación artificial.



Foto 12. Búsqueda de embriones en laboratorio



Foto 13. Clasificación de embriones



Foto 14. Congelación de embriones



Foto 15. Proceso de transferencia de embrión



Foto 16. Embriones viables y transferibles



Foto 17. Proceso de transferencia de embrión



Foto 18. Equipo técnico que trabajó en el proceso de investigación.

Anexo 2. Costos de producción de embriones del protocolo P1 (12 horas)

Materiales medios y equipos	UM	Cantidad	Costo Unitario	Sub Total	Total S/	Total \$	%
Costos Variables							88,08
Materiales de laboratorio					1.664,00	495,24	13,05
Manguera colectora + filtro	Unidad	6	140,00	840,00		250,00	6,59
Pajillas 1/4 - gama irradiate DT	Unidad	25	6,20	155,00		46,13	1,22
Jeringas de 20 ml	Unidad	48	2,40	115,20		34,29	0,90
Placa petri cuadrada	Unidad	8	14,00	112,00		33,33	0,88
Jeringas de 10 ml	Unidad	42	2,20	92,40		27,50	0,72
Acrodiscos milipore	Unidad	6	14,00	84,00		25,00	0,66
Placa pretri redonda	Unidad	14	4,50	63,00		18,75	0,49
Tapón de pajuelas con adaptador de 1/4 a 1/2	Unidad	25	1,20	30,00		8,93	0,24
Pajillas 1/4 -gama irradiate	Unidad	5	4,80	24,00		7,14	0,19
Punta de Micropipetas Aguja 21 - 1*1/2	Unidad	66	0,50	33,00		9,82	0,26
Camisa Sanitaria	Unidad	26	0,90	23,40		6,96	0,18
Guantes obstétrico (100/caja)	Unidad	36	0,65	23,40		6,96	0,18
Jeringas de 05 ml	Unidad	66	0,35	23,10		6,88	0,18
Agujas 22 - 1*1/2	Unidad	78	0,20	15,60		4,64	0,12
Pipetas de plástico	Unidad	12	1,20	14,40		4,29	0,11
Pajuelas 1/2 pkt 5	Unidad	25	0,26	6,50		1,93	0,05
Funda de Inseminación	Unidad	18	0,50	9,00		2,68	0,07
Medios Hormonales					5.654,00	1.682,74	44,35
Folltropin FSH 20ml	Frasco	6	800,00	4.800,00		1.428,57	37,65
CIDR pkt/10	Unidad	6	75,00	450,00		133,93	3,53
Lutalise LH 30ml	Frasco	3	98,00	294,00		87,50	2,31
Hormona GnRH 10ml	Frasco	2	48,00	96,00		28,57	0,75
Benzoato de estradiol 10ml	Frasco	1	14,00	14,00		4,17	0,11
Medios de laboratorio					3.909,50	1.163,54	30,67
Pajuelas con semen congelado	Unidad	18	80,00	1.440,00		428,57	11,30
Complete flush	Bolsa	13	110,00	1.430,00		425,60	11,22
Medio de mantenimiento	Sachet	3	112,00	336,00		100,00	2,64
Medio de congelación de embrión	Sachet	1	145,00	145,00		43,15	1,14
Nitrógeno Líquido	Kilo	6	16,00	96,00		28,57	0,75
Selenio inyectable 250ml	Frasco	1	90,00	90,00		26,79	0,71
Oxitetraciclina 250	Frasco	1	88,00	88,00		26,19	0,69
Fosforo inyectable 250ml	Frasco	1	85,00	85,00		25,30	0,67
Alcohol 70°	Litro	4	9,00	36,00		10,71	0,28
Yodo	Litro	1	36,00	36,00		10,71	0,28
Algodón	Kilo	1,5	22,00	33,00		9,82	0,26
Lidocaina 2% frasco/20 ml	Frasco	2	15,00	30,00		8,93	0,24
Vitamina ade 50ml	Frasco	1	28,00	28,00		8,33	0,22
Gel lubricante	Litro	0,5	45,00	22,50		6,70	0,18
Papel toalla	Unidad	14	1,00	14,00		4,17	0,11
Costos Fijos							11,92
a. Servicio personal especializado en transferencia	Global	1	800,00	800,00	800,00	238,10	6,28
b. Alquiler de equipos de laboratorio	Global	1	600,00	600,00	600,00	178,57	4,71
c. Transporte de equipo de transferencia	Global	1	120,00	120,00	120,00	35,71	0,94
Total costo en el Primer Protocolo					12.747,50	3.793,90	100,00
Costo de Produccion por embrion/Primer Protocolo					554,24		
En Dolares Americanos 3.36					164,95		

Anexo 3. Costo de producción de embriones del protocolo P2 (24 horas)

Materiales medios y equipos	UM	Cantidad	Costo Unitario	Sub Total	Total S/	Total \$	%
Costos Variables							88,31
Materiales de laboratorio					1.927,80	573,75	14,83
Manguera colectora + filtro	Unidad	6	140,00	840,00		250,00	6,59
Pajillas 1/4 - gama irradiate DT	Unidad	55	6,20	341,00		101,49	2,68
Jeringas de 20 ml	Unidad	48	2,40	115,20		34,29	0,90
Placa petri cuadrada	Unidad	8	14,00	112,00		33,33	0,88
Jeringas de 10 ml	Unidad	42	2,20	92,40		27,50	0,72
Acrodiscos milipore	Unidad	6	14,00	84,00		25,00	0,66
Placa petri redonda	Unidad	14	4,50	63,00		18,75	0,49
Tapón de pajuelas con adaptador de 1/4 a 1/2	Unidad	55	1,20	66,00		19,64	0,52
Pajillas 1/4 - gama irradiate	Unidad	10	4,80	48,00		14,29	0,38
Punta de Micropipetas Agujas 21 - 1*1/2	Unidad	86	0,50	43,00		12,80	0,34
Camisa Sanitaria	Unidad	26	0,90	23,40		6,96	0,18
Guantes obstétrico (100/caja)	Unidad	36	0,65	23,40		6,96	0,18
Jeringas de 05 ml	Unidad	66	0,35	23,10		6,88	0,18
Agujas 22 - 1*1/2	Unidad	78	0,20	15,60		4,64	0,12
Pipetas de plástico	Unidad	12	1,20	14,40		4,29	0,11
Pajuelas 1/2 pkt 5	Unidad	55	0,26	14,30		4,26	0,11
Funda de Inseminación	Unidad	18	0,50	9,00		2,68	0,07
Medios Hormonales					5.654,00	1.682,74	43,48
Folltropin FSH 20ml	Frasco	6	800,00	4.800,00		1.428,57	37,65
CIDR pkt/10	Unidad	6	75,00	450,00		133,93	3,53
Lutalise LH 30ml	Frasco	3	98,00	294,00		87,50	2,31
Hormona GnRH 10ml	Frasco	2	48,00	96,00		28,57	0,75
Benzoato de estradiol 10ml	Frasco	1	14,00	14,00		4,17	0,11
Medios de laboratorio					3.900,50	1.160,86	30,00
Pajuelas con semen congelado	Unidad	18	80,00	1.440,00		428,57	11,30
Complete flush	Bolsa	13	110,00	1.430,00		425,60	11,22
Medio de mantenimiento	Sachet	3	120,00	360,00		107,14	2,82
Medio de congelación de embrión	Sachet	1	112,00	112,00		33,33	0,88
Nitrógeno Líquido	Kilo	6	16,00	96,00		28,57	0,75
Selenio inyectable 250ml	Frasco	1	90,00	90,00		26,79	0,71
Oxitetraciclina 250	Frasco	1	88,00	88,00		26,19	0,69
Fosforo inyectable 250ml	Frasco	1	85,00	85,00		25,30	0,67
Alcohol 70°	Litro	4	9,00	36,00		10,71	0,28
Yodo	Litro	1	36,00	36,00		10,71	0,28
Algodón	Kilo	1,5	22,00	33,00		9,82	0,26
Lidocaina 2% frasco/20 ml	Frasco	2	15,00	30,00		8,93	0,24
Vitamina ADE 50ml	Frasco	1	28,00	28,00		8,33	0,22
Gel lubricante	Litro	0,5	45,00	22,50		6,70	0,18
Papel toalla	Unidad	14	1,00	14,00		4,17	0,11
Costos Fijos							11,69
a. Servicio personal especializado en tranferencia	Global	1	800,00	800,00	800,00	238,10	6,15
b. Alquiler de equipos de laboratorio	Global	1	600,00	600,00	600,00	178,57	4,61
c. Transporte de equipo de transferencia	Global	1	120,00	120,00	120,00	35,71	0,92
Total costo en el Primer Protocolo					13.002,30	3.869,73	100,00
Costo de Produccion por embrión/Primer Protocolo					260,05		
En Dolares Americanos 3.36					77,39		

Anexo 4. Costos de producción de embriones del protocolo P3 (36 horas)

Materiales medios y equipos	UM	Cantidad	Costo Unitario	Sub Total	Total S/	Total \$	%
Costos Variables							88,17
Materiales de laboratorio					1.769,60	526,67	13,78
Manguera colectora + filtro	Unidad	6	140,00	840,00		250,00	6,59
Pajillas 1/4 - gama irradiate DT	Unidad	35	6,20	217,00		64,58	1,70
Jeringas de 20 ml	Unidad	48	2,40	115,20		34,29	0,90
Placa petri cuadrada	Unidad	8	14,00	112,00		33,33	0,88
Jeringas de 10 ml	Unidad	42	2,20	92,40		27,50	0,72
Acrodiscos milipore	Unidad	6	14,00	84,00		25,00	0,66
Placa pretri redonda	Unidad	14	4,50	63,00		18,75	0,49
Tapón de pajuelas con adaptador de 1/4 a 1/2	Unidad	35	1,20	42,00		12,50	0,33
Pajillas 1/4 - gama irradiate	Unidad	10	4,80	48,00		14,29	0,38
Punta de Micropipetas Agujas 21 - 1*1/2	Unidad	76	0,50	38,00		11,31	0,30
Camisa Sanitaria	Unidad	26	0,90	23,40		6,96	0,18
Guantes obstétrico (100/caja)	Unidad	36	0,65	23,40		6,96	0,18
Jeringas de 05 ml	Unidad	66	0,35	23,10		6,88	0,18
Agujas 22 - 1*1/2	Unidad	78	0,20	15,60		4,64	0,12
Pipetas de plástico	Unidad	12	1,20	14,40		4,29	0,11
Pajuelas 1/2 pkt 5	Unidad	35	0,26	9,10		2,71	0,07
Funda de Inseminación	Unidad	18	0,50	9,00		2,68	0,07
Medios Hormonales					5.654,00	1.682,74	44,02
Folotropin FSH 20ml	Frasco	6	800,00	4.800,00		1.428,57	37,65
CIDR pkt/10	Unidad	6	75,00	450,00		133,93	3,53
Lutalise LH 30ml	Frasco	3	98,00	294,00		87,50	2,31
Hormona GnRH 10ml	Frasco	2	48,00	96,00		28,57	0,75
Benzoato de estradiol 10ml	Frasco	1	14,00	14,00		4,17	0,11
Medios de laboratorio					3.900,50	1.160,86	30,37
Pajuelas con semen congelado	Unidad	18	80,00	1.440,00		428,57	11,30
Complete flush	Bolsa	13	110,00	1.430,00		425,60	11,22
Medio de mantenimiento	Sachet	3	120,00	360,00		107,14	2,82
Medio de congelación de embrión	Sachet	1	112,00	112,00		33,33	0,88
Nitrógeno Líquido	Kilo	6	16,00	96,00		28,57	0,75
Selenio inyectable 250ml	Frasco	1	90,00	90,00		26,79	0,71
Oxitetraciclina 250	Frasco	1	88,00	88,00		26,19	0,69
Fosforo inyectable 250ml	Frasco	1	85,00	85,00		25,30	0,67
Alcohol 70°	Litro	4	9,00	36,00		10,71	0,28
Yodo	Litro	1	36,00	36,00		10,71	0,28
Algodón	Kilo	1,5	22,00	33,00		9,82	0,26
Lidocaina 2% frasco/20 ml	Frasco	2	15,00	30,00		8,93	0,24
Vitamina ADE 50ml	Frasco	1	28,00	28,00		8,33	0,22
Gel lubricante	Litro	0,5	45,00	22,50		6,70	0,18
Papel toalla	Unidad	14	1,00	14,00		4,17	0,11
Costos Fijos							11,83
a. Servicio personal especializado en transferencia	Global	1	800,00	800,00	800,00	238,10	6,23
b. Alquiler de equipos de laboratorio	Global	1	600,00	600,00	600,00	178,57	4,67
c. Transporte de equipo de transferencia	Global	1	120,00	120,00	120,00	35,71	0,93
Total costo en el Primer Protocolo					12.844,10	3.822,65	100,00
Costo de Produccion por embrión/Primer Protocolo					414,33		
En Dolares Americanos 3.36					123,31		

TESIS HOJA DE CAMPO

RESPONSABLE: TESISTA
Bach. Dante H. MARCA CH
Email: embriones.peru@hotmail.com
Cel: 951 - 414703 - #999499400

REGISTRO DE CONGELACION DE EMBRIONES

RANCHO FCA - UNAP. ILLAO

FECHA 30/10/15

DONADORA COMELIA

DONADORA

DONADORA

SEMENTAL DAVENPORT

SEMENTAL

SEMENTAL

N° TOTAL DE EMBRIONES 05

N° TOTAL DE EMBRIONES

N° TOTAL DE EMBRIONES

HORA DE RECOLECCION 3:25 PM.

HORA DE RECOLECCION

HORA DE RECOLECCION

INICIO CRIOPROTECTOR 5:00 PM.

INICIO CRIOPROTECTOR

INICIO CRIOPROTECTOR

PAJILLA	ESTADIO	CALIDAD	ESTADIO	CALIDAD
1	5	1		
2	5	1		
3	5	1		
4	5	1		
5	5	1		
6				
7				
8				
9				
10				

PAJILLA	ESTADIO	CALIDAD	ESTADIO	CALIDAD
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

PAJILLA	ESTADIO	CALIDAD	ESTADIO	CALIDAD
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

SEED: HORA 5:7 TEMP -5.8

SEED: HORA _____ TEMP _____

SEED: HORA _____ TEMP _____

TEMPERATURA INICIAL -5.8 °C
HORA DE INICIO CONGEL 5:12
TEMPERATURA FINAL 30.5 °C
PROMEDIO DE DECESO 0.6 °C

MEDIO DE RECOLECCION COMPLET FLUSH
MEDIO DE CONGELACION BUTYLEN GLYCOL
MEDIO P/ DESCONGELACION TRANSFERENCIA DIRECTA

TESIS HOJA DE CAMPO

RESPONSABLE: TESISTA
 Bach. Dante H. MARCA CH.
 Bach. Paul ARACAYO M.
 Email: embriones.peru@hotmail.com
 Cel: 951 - 414703 - #999499400

REGISTRO DE RECEPTORAS POR T.E. FRESCO

RANCHO: CIP- LLLPA-UNAP PROT. SINCRON SE. + CIDR. T.F.
 COND. CORPORAL: 2.7. FECHA DE TRANSF. 14/03/15
 OBSERVACIONES: FECHA EVALUACION GESTACION 18/05/15

NUMERO	ESTRO / HORA	OVARIOS	ESTADIC	DONADORA	HORA	TEC	DG	OBSERV.
1	0904 16'30-	D+++	5-1	COMSLIA	18:10	DH	✓	PMSG
2	0920 16'30-	D+++	5-1	COMSLIA	18:20	DH	●	B.E.
3	0901 16'30-	D+++	5-2	COMSLIA	18:30	DH	✓	M.E. 2da NATURAL ESTRO 9/0
4	07 0703 -M.	D+++	5-1	COMSLIA	18:35	DH	●	GRPA
5	0957 07'03 -M.	I+++	4-1	COMSLIA	18:3	DH	✓	PMSG.
6	/ -							
7	/ -			DAVENPORT.				
8	/ -							
9	FECHA 10-06-15	Evaluación de preñez						3 meses en total
10	0920	vaca boca LENA.	cuerno derecho		07 cm.	✓		
11	07	Jaquillara	lema 2 dntz		10 cm.	✓		
12	/ -							
13	INSEMINACION DONADORA 2da fecha							toro CARTER
14	FECHA = 12-06-15 hora 7:40 am							
15	/ -							
16	/ -							
17	/ -							
18	/ -							
19	/ -							
20	/ -							

DG= EL DIA DE LA PALPACION SE LLENA ESTE CUADRO CON UN PUNTO GRANDE LOS QUE SON GESTANTES Y UNA V SI SON VACIAS

RESPONSABLE: **TECISTA**
 Bach. Dante H. MARCA CH.
 Bach. Paul ARACAYO M.
 Email: embriones.peru@hotmail.com
 Cel: 951 - 414703 - #999499400

TESIS

REGISTRO DE CAMPO - S.O. DONADORA

HOJA DE CAMPO
 N°: 0121
 RANCHO: ANDES #152ARAZA

FECHA DE RECOLECCION: 11 - NOV - 2015

REGISTRO DE DONADORAS

PROPIETARIO: YANIEL ROMERO P.

IDENTIFICACION	RAZA	E. BASE	SUPEROVULACION		INSEMINACION		RESPUESTA		FERT.	OVULOS	DEGEN.	TRANSF.	CONGEL.
			INICIO	HORM.	DOSIS	SEMENTAL	SERVICIOS	O.D.					
TORENINA	B.S.	3 ^{ra} DIB. 15	31/10/15	FAUZADAN	I - II - III - IV I - II - III -	CORTEZ.	I - II - III	8 CL. 4 CL.	11	0	0	0	1 L.

IDENTIFICACION	ESTRO DE INSEMINACION			RECOLECCION			
	FECHA	HORA	DURACION	INICIO	FINALIZO	MEDIO	TECNICO
TORENINA	04/11/15	8:00 PM	1 Yhrs.	2:35 P	3:00 PM	COMPLET. FLUSA	DM
	1 1	:					
	1 1	:					
	1 1	:					
	1 1	:					
	1 1	:					

OBSERVACIONES: FALTO MEDIO DE COLECCION - LIGERO FLUJO TURBULENTO.

Hoja DE CAMPO
No: 0117

TESIS
HOJA DE CAMPO

RESPONSABLE: TESISTA
Bach. Dante H. MARCA CH.
Email: embriones.peru@ hotmail.com
Cel: 951 - 414703 - #999499400

REGISTRO DE CONGELACION DE EMBRIONES

RANCHO ISTARATA - MURDO
FECHA 11/11/15

DONADORA TORNINA

DONADORA

DONADORA

SEMENTAL CARTER.

SEMENTAL

SEMENTAL

N° TOTAL DE EMBRIONES 11.

N° TOTAL DE EMBRIONES

N° TOTAL DE EMBRIONES

HORA DE RECOLECCION 2:35 PM.

HORA DE RECOLECCION

HORA DE RECOLECCION

INICIO CRIOPROTECTOR 4:55 PM

INICIO CRIOPROTECTOR

INICIO CRIOPROTECTOR

PAJILLA	ESTADIO	CALIDAD	ESTADIO	CALIDAD
1	5	1	4	2
2	5	1		
3	5	1		
4	5	1		
5	5	1		
6	5	1		
7	5	1		
8	4	1		
9	4	1		
10	4	1		

PAJILLA	ESTADIO	CALIDAD	ESTADIO	CALIDAD
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

PAJILLA	ESTADIO	CALIDAD	ESTADIO	CALIDAD
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

SEED: HORA 5:12 TEMP. 6.7

SEED: HORA _____ TEMP. _____

SEED: HORA _____ TEMP. _____

TEMPERATURA INICIAL -6.8 °C

MEDIO DE RECOLECCION COMPLET FLUSH.

HORA DE INICIO CONGEL. 5:14 PM.

MEDIO DE CONGELACION ETHYLEN GLYCOL.

TEMPERATURA FINAL 32.5 °C

MEDIO P/ DESCONGELACION DT.

PROMEDIO DE DECENSO 0.8 °C

TESIS HOJA DE CAMPO

RESPONSABLE: TESISTA
Bach. Dante H. MARCA CH.
Bach. Paul APACAYO M.
Email: embriones.peru@hotmail.com
Cel: 951 - 414703 - #999499400

RANCHO: CIP 122PA - FCD - UNA PUNO
PROPIETARIO: UNA - PUNO

FECHA: 14-03-15

RECEPTORAS TRANSFERIDAS CON EMBRION FRESCO

RECEPTORA	DONADORA	TORO	OBSERV.
1 0909	CONSUELA	DOVENSPORT.	✓
2 0920	CONSUELA	DOVENSPORT.	✓
3 0901	CONSUELA	DOVENSPORT.	✓
4 07	CONSUELA	DOVENSPORT.	✓
5 0957	CONSUELA	DOVENSPORT.	✓
6			
7			
8			
9			
10			

V°B°
TEC. TRANSFERENCISTA

TESIS

HOJA DE CAMPO

RESPONSABLE: TESISTA
 Bach. Danilo H. MARCA CH
 Bach. Paul ARACAYO M
 Email: embrionesperu@hotmail.com
 Cel: 951 - 414703 - #999-199400

RANCHO: CIP. FCA - UNAP.

PROPIETARIO UNAS - PUNO

F. DE REVISION: 09 / 02 / 15

DIRECCION: CIP ILIPA - UNDA PUNO.

DONADORA	RAZA/ICC	NºPARTOS/ EDAD	F. DE ESTRO.	EV. OD	EV. OI	TRATAMIENTO	FARMACO	OBSERV.
COMSIA	B/S	3/10	02/02	CL+T	S/R.	CURACION UTERINO	EMICINA.	60ml. ZANONA
JOPANA	B/S	3/7	09/02	CLD++	F++	DITESTALINA	DITESTRO	55 ml. S/R
DORINA	S/R	2/6	02/02	CL+	CL++	Querosol UT.	DITESTALIN	50ml.

ESP. V°B°

TESIS
HOJA DE CAMPO.



RESPONSABLE: EMPRESA ***EMBRIONES***

Esp. Ing. Dante H. MARCA CH.

Email: embriones@peru hotmail.com

Cel: 951 - 414703

RANCHO : FUNDO ISPARATA - MURGA

FECHA DE RECOLECCION: 14-05-15

REGISTRO DE DONADORAS

PROPIETARIO: JAMEL ROMERO.

IDENTIFICACION	RAZA	E. BASE	SUPEROVULACION		INSEMINACION		RESPUESTA		FERT.	OVULOS	DEGEN.	TRANSF.	CONGEL
			INICIO	HORM.	SEMENTAL	SERVICIOS	O.D.	O.I.					
MELISSA	B.S.	DIST B.E.	20/04	FOLLICULAR	VIGOR	I-II	4	5	7	2	0	0	7

IDENTIFICACION	ESTRO DE INSEMINACION			DURACION	INICIO	FINALIZO	RECOLECCION		
	FECHA	HORA	HORA				MEDIO	TECNICO	
MELISSA	7 1051/5	16:30M.	:	12HRS.	15:05	15:35	COMPLETA	FLUSA.	DA.

OBSERVACIONES: Se realizó la I.A. 2 papels al mismo tiempo. Inyectado
 OnPH. - después de 3hrs. Muestre Reto / 08 LA Edoris P.R.O.O.m.
 Separación vagina agachados por DIB.

TESIS

Hoja de Campo



Puno, a 08 de Setiembre del 2015.

RESPONSABLE: EMBRIONES*PERU
Esp. Ing. Dante H. MARCA CH.
Email: embriones.peru@ hotmail.com
Cel: 999-944900 - 951-414703 - RPM: #999-499400

RANCHO: 1STORATA - NONOJA FECHA: DIA 09 / 09 / 2015
PROPIETARIO: YOMEL ROMERO PERALTA FECH. T.E: 20/06/15

RECEPTORAS TRANSFERIDAS CON EMBRION CONGELADO

RECEPTORA	DONADORA	SEMENTAL	F. DE RECOLECCION	OBSERV.
1 V-88	MELLISA	VIGOR	14-may-15	PREÑADA DT 04
2 V-77	MELLISA	VIGOR	14-may-15	PREÑADA DT 02
3 V-87	MELLISA	VIGOR	15-may-15	PREÑADA DT 02.
4 T-7	MELLISA	VIGOR	16-may-15	VACIA DT —
5 N-17	MELLISA	VIGOR	17-may-15	ABORTO - DT —
6 V-86.	MELLISA	VIGOR	18-may-15	VACIA DT —
7				
8				
9				
10				
11				
12				

COPIA PRODUCTOR

EMBRIONES
PRODUCIMOS Y TRANSFERIMOS
ESP. DANTE H. MARCA CH. DIRECTOR GENERAL



TESIS

Puno, a 08 de Setiembre del 2015.

RESPONSABLE: EMBRIONES*PERU
Esp. Ing. Darío H. MARCA CH.
Email: embriones.peru@hotmail.com
Cel: 999-944900 - 951-414703 - RPM: #999-499400

RECEPTORAS TRANSFERIDAS CON EMBRION CONGELADO D.T.

RANCHO: ISTORATO - NUÑEDA

MEDIO DE DESCONGELACION: TRANSFERENCIA DIRECTA

Propietario: YANEL RONCERO PERALTA

Observaciones: PG 2 B.T.E.

RECEP.	F. DE ESTRO	OV.	F. DE T.E.	DONADORA	TORO	ESTAD.	F. DE RECOL.	D.G.	OBSERV.
1	V 88	12/06	D ³	20/06	MELUSA	SUN-MADEN VIGOR ET *TM	5-7	14-may-15	DT
2	V 77	13/06	D ³	20/06	MELUSA	SUN-MADEN VIGOR ET *TM	5-7	14-may-15	DT
3	V 87	13/06	I ²	20/06	MELUSA	SUN-MADEN VIGOR ET *TM	5-7	14-may-15	DT
4	T 7	13/06	I ³	20/06	MELUSA	SUN-MADEN VIGOR ET *TM	5-7	14-may-15	DT
5	N 17	13/06	D ³	20/06	MELUSA	SUN-MADEN VIGOR ET *TM	5-7	14-may-15	DT
6	V 86	13/06	D ²	20/06	MELUSA	SUN-MADEN VIGOR ET *TM	5-7	14-may-15	DT
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									

