

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE ZOOTECNIA



TRABAJO MONOGRAFICO

**PRODUCCION DE EMBRIONES IN VIVO EN TRES RAZAS
DE GANADO LECHERO**

Presentado por:

EDUARDO FERNANDEZ CURI

TESIS PARA OPTAR EL TITULO

INGENIERO ZOOTECNISTA

Lima - Perú

2014

A mis padres y hermanos por su apoyo
incondicional en mi formación profesional y personal.

ÍNDICE GENERAL

		Pág.
I.	INTRODUCCION	1
II.	REVISION DE LITERATURA	2
2.1.	Fisiología reproductiva de la hembra bovina	2
2.1.1.	Regulación endocrina de los ciclos estruales	2
2.1.2.	Crecimiento folicular y la ovulación	3
2.2.	Producción de embriones en bovinos	5
2.2.1.	Múltiple ovulación y transferencia de embriones	5
2.2.1.1.	Superestimulación ovárica	6
2.2.1.2.	Recuperación de embriones	7
2.2.1.3.	Clasificación de embriones	9
2.2.1.4.	Conservación de los embriones	14
2.2.1.5.	Transferencia de embriones	15
2.2.2.	Fecundación in vitro	15
2.3.	Importancia de la tecnología de producción de embriones	16
2.3.1	Mejoramiento genético	16
2.3.2	Eficiencia reproductiva	17
2.4.	Factores que afectan la superovulación de donadoras	19
2.4.1.	Estado del ovario en el momento del tratamiento	20
2.4.2.	Edad de las donadoras	21
2.4.3.	Estado nutricional	22
2.4.4.	Historial reproductivo	23
2.4.5.	Tratamientos sucesivos	24
2.4.6.	Raza	25
III.	MATERIALES Y METODOS	26
3.1.	Ubicación	26
3.2.	Animales	26

3.3.	Manejo de animales	27
3.4.	Materiales y equipos utilizados	28
3.4.1.	Superovulacion e inseminación artificial.	28
3.4.2.	Colecta de embriones.	28
3.4.3.	Búsqueda y conservación de embriones.	29
3.5.	Sincronización y superovulación de donantes.	29
3.6.	Colección, búsqueda y clasificación de embriones	32
3.7.	Diseño experimental	36
3.8.	Análisis Estadístico.	36
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
V.	CONCLUSIONES	42
VI.	RECOMENDACIONES	43
VII.	BIBLIOGRAFIA	44
VIII.	ANEXO	49

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
01. Desarrollo Histórico de la transferencia de embriones	5
02. Producción de embriones en diferentes días del ciclo estral en vaquillas.	20
03. Comparación de las tasas de producción de embriones de vacas fértiles o infértiles.	24
04. Embriones viables totales de las tres razas y número de embriones por vaca.	38
05. Embriones viables por raza y número de embriones por raza.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
01. Diagrama de recuperación de embriones.	9
02. Estadio de embriones post fertilización.	11
03. Estadios de desarrollo de embriones.	13
04. Esquema de aplicación del protocolo de superovulación.	30
05. Protocolo utilizado para donadora a 340 mg de FSH.	31
06. Embriones bovinos en diferentes estados de desarrollo	35
07 Representación esquemática de una pajilla con un embrión congelado.	36
08. Distribución de estructuras recuperadas por colecta.	39

RESUMEN

La transferencia de embriones es una tecnología que permite incrementar la tasa reproductiva de los animales élite productiva, reproductiva y sanitariamente. Con la finalidad de evaluar la respuesta de tasa de recuperación de embriones viables producidos mediante el uso de la técnica de producción de embriones “IN VIVO” (Múltiple Ovulación y Transferencia de embriones) en razas de ganado bovino, para lo cual se utilizaron 65 donadoras de las razas Holstein, Brown Swiss y Fleckvieh; además determinar si hay diferencias en producción de embriones viables entre razas. Se aplicó el mismo protocolo de superovulación Folltropin®, para todas las donadoras. En la recolección de embriones mediante método no quirúrgico, evaluación y de clasificación se encontraron de 252 embriones viables de las tres razas; de los cuales 72 embriones viables fueron de la raza Holstein, 78 embriones viables de la raza Brown Swiss y de 102 embriones viables de la raza Fleckvieh. El número de embriones viables por donadora fue en promedio de 3.9 ± 0.9 embriones para las tres razas de ganado lechero. En el caso de Holstein el promedio de 4.8 ± 1.2 embriones viables, las Brown Swiss 3.5 ± 0.9 embriones y para el caso de las Fleckvieh de 3.6 ± 0.8 embriones. Al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencia en las medias entre las tres razas evaluadas, por lo que este efecto no es fue prioritario en la respuesta de embriones viables por donadora, sino factores fisiológicos individual y niveles productivos que afectan la tasa de recuperación de embriones viables por donadora.

Palabras claves: Bovino, embriones, superovulación, MOET

I. INTRODUCCION

Las biotecnologías reproductivas aplicadas en bovinos se han desarrollado durante el siglo XX. La técnica de inseminación artificial históricamente tiene una antigüedad de 3000AC, a pesar de ello su adopción fue después de la segunda guerra mundial, debido al descubrimiento de los crioprotectores para conservar el semen por tiempo indefinido (Polge y Rowson, 1952). Es a partir de esta metodología que los programas de mejora genética tomaron un avance muy grande, con la difusión a nivel masivo de machos superiores (Peters, 1991).

En la década del 60, del siglo XX, el control del ciclo estral permitió simplificar la aplicación de la inseminación artificial, al mismo tiempo, el desarrollo de superovulación para realizar una recuperación repetida de embriones de donantes, hizo posible el desarrollo de la transferencia de embriones para incrementar la tasa reproductiva de la hembras de alto valor productivo y genético (Alberio, 2003). La transferencia de embriones es una herramienta de la biotecnología reproductiva que desde el año 1951, se viene aplicando, con resultados exitosos (Willett *et al*, 1951).

Los factores que afectan los resultados de un programa de transferencia de embriones en condiciones de campo y sobre los que se puede efectuar el control de calidad son: higiene del laboratorio; esterilización del instrumental; medios de cultivo y criopreservación; selección por aptitud funcional y sanitarias de donantes y receptoras; control de celos; selección de hormonas gonadotróficas y prostaglandinas; calidad del semen; efecto de la calidad del embrión y del día del ciclo de la receptora. Adicionalmente, tener una organización de un grupo humano especialmente entrenado y capacitado para la atención minuciosa, puede ser la llave del éxito (Munar, 2003).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de tres razas en la producción de embriones in vivo en bovinos.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Fisiología reproductiva de la hembra bovina

La dinámica folicular en la hembra bovina es desencadenante de los procesos reproductivos y de las fases del ciclo estral, sin embargo, estos eventos están regulados por un complejo conjunto de factores que se interrelacionan y permiten que se presente la ovulación como punto final del ciclo estral y punto de inicial en la vida reproductiva de la hembra bovina (Motta *et al.*, 2011).

Durante el ciclo estral se producen ondas de crecimiento folicular. Cada onda se caracteriza por la emergencia de un grupo de folículos con un diámetro de 4 mm que crecen por pocos días. Posteriormente, se produce la desviación folicular caracterizada porque el folículo más grande continua creciendo y los otros regresionan. El folículo que continua desarrollándose se lo denomina dominante e inhibe el crecimiento de los demás folículos, llamados subordinados (Callejas, 2004).

2.1.1 Regulación endocrina de los ciclos estruales

El ciclo estrual es regulado por mecanismos endocrinos y neuroendocrinos; esto es, por hormonas hipotalámicas, gonadotropinas y esteroides secretados por los ovarios. La regulación de la secreción de gonadotropina durante el ciclo estrual requiere un delicado equilibrio entre complejas interacciones hormonales. Un componente que se sabe influye de manera importante es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRh). Los cambios en las tasas de síntesis y liberación de GnRH, así como la velocidad de degradación de dicha hormona, son factores adicionales que modifican su papel en la influencia sobre la liberación de gonadotropinas. A nivel del ovario, el periodo estrual se caracteriza por una elevada secreción de estrógenos a partir de los folículos de Graf preovulatorios. Los estrógenos estimulan el crecimiento uterino por un mecanismo en el que participan la interacción de la hormona con receptores y el incremento en procesos sintéticos dentro de las células. Los estrógenos también estimulan la producción de prostaglandinas por el útero (Hafez, 2002).

Durante cada ciclo estral, los ovarios bovinos sintetizan y secretan estrógenos y progesterona, los cuales coordinan la función del sistema reproductivo femenino. Cada ciclo estral comprende una fase folicular y una fase luteal. La fase folicular se caracteriza por el desarrollo de un folículo preovulatorio que secreta estrógenos, mientras que la fase luteal se caracteriza por la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, el cual se forma después de la ovulación del folículo preovulatorio. Al final de la fase luteal, el cuerpo lúteo involucrea por acción de la prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), y ocurre el desarrollo final del próximo folículo preovulatorio. La secreción de gonadotrofinas juega un rol central en el control del ciclo estral. El folículo preovulatorio en desarrollo produce un nivel crítico de estrógeno que estimula al hipotálamo para aumentar la frecuencia y amplitud de los pulsos de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Se sugiere que esto ocurre en bovinos, basado en un aumento de la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH. El incremento en los pulsos de LH amplifica la secreción de estrógenos, completa el desarrollo folicular, induce el comportamiento estral y estimula la onda preovulatoria de LH (Díaz, 1999).

2.1.2 Crecimiento folicular y la ovulación

El control endocrino de la maduración folicular se basa en las células de la granulosa y la teca. Si los folículos alcanzan su fase de desarrollo receptivo a las gonadotropinas, las células de la granulosa presentan receptores para FSH y las células de la teca presentan receptores para LH. Al comienzo, el número de receptores de FSH de una célula de la granulosa es limitado, de manera que un folículo en crecimiento solamente puede multiplicar hasta cierto punto los receptores de FSH de una célula de la granulosa, ya que su retroalimentación sería limitada. A medida que el folículo sigue creciendo, se va aumentando el número de células de la granulosa, lo cual colabora en el incremento acelerado del número de receptores de FSH. Puesto que el estrógeno sintetizado tiene un efecto mitógeno (estimulante de la mitosis), el destino final del folículo dependerá de si es capaz de sintetizar estrógenos en cantidad suficiente para aumentar el número de sus células, aumentando así indirectamente el número de receptores para FSH. Solamente cuando es capaz de convertir los andrógenos procedentes de la teca en estrógenos,

consigue mantener un microambiente impregnado de estrógeno. Si no lo consigue, sufre una transformación andrógena y la consecuente atresia (Tovia y Duica, 2012).

El crecimiento, maduración, ovulación y luteinización del folículo de Graaf dependen de patrones apropiados de secreción y concentraciones suficientes y proporcionales de FSH y LH en suero. Entre las hormonas participantes se incluyen esteroides, prostaglandinas y glucoproteínas. La FSH tiene la función importante en el inicio de la formación del antro. Esta gonadotropina estimula la mitosis de las células de la granulosa y la formación del líquido folicular. Además, la hormona folículo estimulante induce la sensibilidad de las células de la granulosa hacia la hormona luteinizante al incrementar el número de receptores para esta última (Hafez, 2002).

El inicio de cada oleada de crecimiento folicular está precedido por un incremento en la concentración de FSH, y después de la misma, hay un descenso significativo de la FSH debido al incremento en la concentración de estradiol. Cuando el folículo de mayor tamaño alcanza los 8 mm, crece a mayor velocidad que el resto y se convierte en el folículo dominante, mientras que los otros regresionan y se convierten en los subordinados. El mecanismo de selección del folículo dominante se basa en una desviación en la capacidad de respuesta a la FSH y LH. Ello implica primero un descenso de la concentración de FSH debido al feedback negativo que ejerce el estradiol y la inhibina producidos por todos los folículos en crecimiento. Un segundo mecanismo importante para la selección del folículo dominante es que cuando este adquiere diámetro clave de 8 mm comienza a desarrollar receptores para LH en las células de la granulosa, ello lo permite seguir creciendo con bajas concentraciones de FSH; hacia el final de la fase de crecimiento, dependiendo de si el cuerpo lúteo regresiona o no, se producirá la ovulación o bien la pérdida de los receptores para la LH y la atresia del folículo dominante. Cuando cesa la secreción de estradiol, la FSH vuelve a subir y ello desencadena la emergencia la siguiente oleada y el ciclo ovárico se vuelve a repetir (Fernández, 2008).

2.2. Producción de embriones en bovinos

2.2.1. Múltiple ovulación y transferencia de embriones

La transferencia de embriones (ovulo fertilizado) es una técnica por el cual los embriones son colectados del tracto reproductivo de la hembra (donadora) antes de la implantación y luego es transferida en el tracto reproductivo de otra hembra (receptora) para completar su desarrollo (gestación).

Cuadro 01. Desarrollo Histórico de la transferencia de embriones (Kanagawa, 1988)

Autor, año	País	Evento	Especies
Heape, 1890	ENG	Primer éxito en T.E.	Coneja (4 cr.)
Beidl et al, 1922		Éxito en T.E.	Coneja
Nicholas, 1933		Éxito en T.E.	Rata
Warwick and Berry, 1934- 49		Éxito en T.E.	Oveja y cabra
Lopyrin et al., 1950		Éxito en T.E.	Oveja
Kvansnickii, 1951		Éxito en T.E.	Cerda
Willet et al, 1951	USA	Éxito en T.E.	Vaca
Oguri an Tsutsumi, 1974	JAP	Éxito en T.E.	Yegua
Kraemer et al, 1976		Éxito en T.E.	Mono
Schriber and Kraemer, 1978		Éxito en T.E.	Gata
Steptoe and Edwards, 1978		Bebe Mujer nacida por T.E.	Mujer
Kinney et al., 1979		Éxito en T.E.	Perra
Marden and Chang, 1952		Primer transporte intercontinental de embrión	Coneja
Alberta Livestock transplants Ltd., 1971	CAN	almacenado a 10° C	Vaca
Whittingham et al., 1972		Primera compañía comercial para T.E. en animales de granja	Ratón
Wilmut and Rowson, 1973		Nacimiento de cría de embrión refrigerado a largo periodo.	Vaca
1974	USA	Nacimiento de cría de embrión congelado. Estableció la “Internacional Embryo Transfer Society”	

2.2.1.1. Superestimulación ovarica

Se denomina superovulación al aumento del número fisiológico de ovulaciones propio de la especie, provocado mediante la administración de gonadotropinas. En el bovino, se considera que hubo respuesta al tratamiento cuando se producen más de dos ovulaciones. La superovulación debe complementarse con un régimen óptimo de inseminación artificial, utilizando semen de muy buena calidad (Palma, 2001).

Mapletoft *et al.* (2002) y Murphy *et al.* (1984) han investigado la actividad biológica de las gonadotropinas y depende de la actividad de FSH y LH, presentes en las preparaciones y son los que afectan la respuesta superovulatoria en vacas. Tres tipos de gonadotropinas pueden ser usadas para inducir superovulación, gonadotropinas de extractos de pituitaria de cerda y otros animales domésticos, gonadotropina coriónica equina (eCG) y hormona menopausica humana (hMG).

La vida media de la FSH en vacas está estimada en menos de 5 h, por lo que se administra dos veces al día para tener éxito en la superovulación de embriones. Usualmente se da en un régimen de 4 a 5 días (2 veces por día) de FSH con una dosis total de 28 a 50 mg (Armour) de extracto de pituitaria cruda (FSH-P) o 400 mg NIH_FSH-PI del extracto de pituitaria purificada, Folltropin®-V (Bioniche Animal Health, Bellville, Canadá). 48 o 72 h después de iniciar el tratamiento se inyecta PGF para inducir luteólisis y el estró ocurra entre 36 y 48 h y una posterior ovulación 24 y 36 h después (Mapletoft *et al.*, 2002).

Gonadotropina coriónica equina (eCG) es un complejo glicoproteico con actividad de FSH y LH y tiene una vida media de 40 h en la vaca y persiste por encima de 10 días en la circulación bovina, de esta manera se inyecta una sola vez y seguida a 48 h después de una de PGF. La larga vida media de la eCG causa una continuada estimulación ovárica, folículos anovulatorios, perfil endocrino anormal y reduce la calidad de los embriones. Estos problemas pueden ser resueltos con la aplicación intravenosa de anticuerpos a eCG al momento de la primera inseminación o 12 a 18 después del inicio

del estro. Se recomienda una dosis de 1500 a 3000UI de eCG (uso más común 2500 UI) (Mapletoft *et al.*, 2002).

Aunque la foliculogénesis en mamíferos requiere de FSH y LH, hay una variabilidad considerable en el contenido de FSH y LH en los preparados crudos de gonadotropina. Murphy *et al.* (1984) investigaron el efecto de la tasa de actividad de FSH/LH de la eCG en la respuesta superovulatoria en ratas inmaduras y se encontró que había una correlación positiva, bajas tasas de actividad de FSH/LH aparentemente reduce la respuesta superovulatoria en ratas y una adicional LH cuando se adiciona con la eCG reduce la respuesta superovulatoria en vacas. Extractos purificados de pituitaria con baja contaminación de LH es reportado como mejorador de la respuesta superovulatoria en vacas.

Monniaux *et al.* (1983) trataron un grupo de vacas con 2500 UI de eCG y otro con 50 mg (Armour) FSH-P y observaron que la tasa de ovulación y el porcentaje de vacas con más de 3 embriones transferibles fue ligeramente más alta con FSH-P que con eCG. Otros investigadores como Mapletoft *et al.* (1990) y Goulding *et al.* (1996) no encontraron diferencias entre extractos de pituitaria (FSH) y eCG.

2.2.1.2. Recuperación de Embriones

Antes de 1976, más vacas eran colectadas por laparotomía (línea media) y menos comúnmente vía incisión del flanco. En ese año varios investigadores publicaron la factibilidad del método no quirúrgico (transcervical) para recuperar embriones y la industria cambio estos procedimientos rápidamente (Seidel, 1991).

La primera transferencia quirúrgica con éxito en bovinos fue lograda por Willet *et al.*, (1951) y practicaron la cirugía bajo anestesia general, con el animal en posición de cubito dorsal y por la línea media. El cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo fue expuesto para ser punzado e introducir el embrión en 0,2 ml de medio. La técnica fue simplificada por

Avery *et al.* (1962) transfiriendo los embriones a la receptora en pie y por el flanco (laparotomía lateral). La primera transferencia no quirúrgica con éxito fue realizada por Mutter *et al.*, (1964) atravesando el cervix con una pipeta de inseminación.

En muchos casos los embriones son recuperados entre 6 a 8 días después de iniciado el estro (día “0”). Los embriones pueden ser recuperados tan tempranamente como a 4 días después del estro, pero a menos del día 6 la tasa de recuperación es baja que en los días 6 a 8. Los embriones podrían ser también recuperados en el día 9 a 14 después del estro, sin embargo al día 9 ó 10 la zona pelúcida se rompe y el embrión se expande y hace más difícil identificarlo y aislarlo y más susceptible a infecciones. Después del día 13, los embriones se elongan dramáticamente y son muchas veces dañados durante la recuperación. Los procedimientos de criopreservación y bisección tiene que ser optimizado con embriones de día 6 a 8, lo cual es una razón más para recuperar en estos días (Seidel, 1991).

La recogida, no quirúrgica, a través de la cervix, por lo general, resulta en la recuperación de alrededor de un 10 % menos de los embriones, pero es un método barato y simple, se evita los riesgos de la anestesia general y se puede realizar en la propia granja. Por lo tanto, las recogidas de embriones, con fines comerciales, se hacen ahora por medios no quirúrgicos. La recuperación de los embriones, vía cervix, solo es posible después de que estos han llegado al útero y se suele realizar en el día 6 del ciclo que sigue a la superovulación (Peters y Ball, 1991).

Los embriones son recuperados mediante lavado utilizando un catéter, tipo Foley de tres vías. En el catéter de tres vías; uno para la admisión de aire con el fin de insuflar el collar o balón que tiene cerca de la punta, otro con una salida muy cerca de la punta para que ingrese el líquido de lavado y el tercero con una abertura, ligeramente por detrás de la punta, para recoger el líquido de lavado, más los embriones que este arrastres desde el útero (Peters y Ball, 1991).

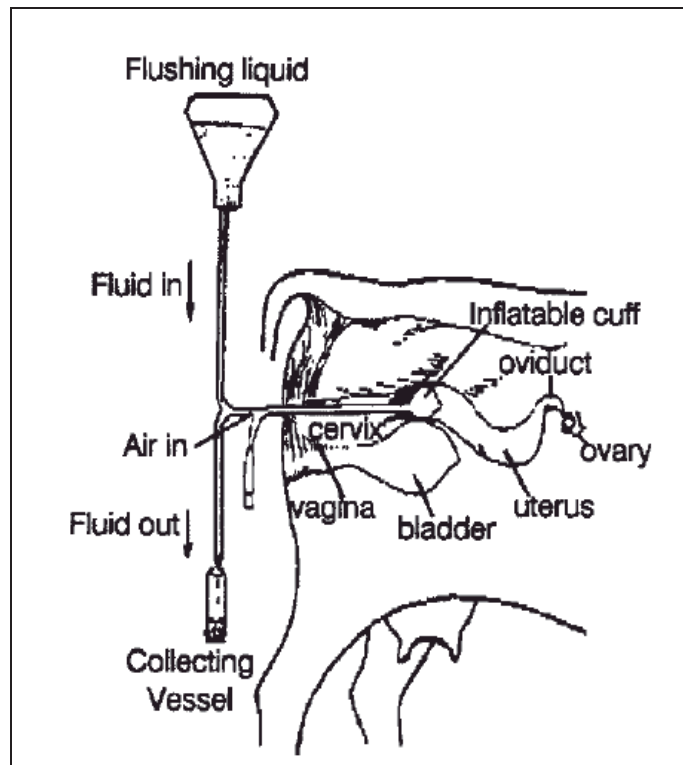


Figura 01: Diagrama de recuperación de embriones (Oklahoma Cooperative Cooperative Service)

Los embriones son ligeramente más densos que el medio de lavado por lo que tienden a depositarse en el fondo del recipiente, normalmente en los dos minutos siguientes. En la práctica, estos recipientes se dejan en reposo unos 10 minutos, al cabo de los cuales se procede a la recuperación de los embriones y para ello se suele sifonar el líquido sobrenadante (Peters y Ball, 1991). Actualmente el uso de filtros para pasar los medios de lavado es una alternativa muy útil y su uso simplifica la búsqueda en rapidez y eficiencia.

2.2.1.3. Clasificación de los embriones

El ovocito es ovulado en la segunda metafase y no completa la meiosis hasta la interacción con el espermatozoide. En el bovino la ovulación se da aproximadamente a 24 horas de iniciado el estro y la primera división se lleva a cabo a 48 horas, después del

estro (Shea, 1981). Este ovocito fecundado o no, es una célula de 150-190 μm de diámetro, incluyendo la zona pelúcida ó membrana pelúcida (una capa glicoproteica) que tiene un grosor de 12 a 15 μm (Lindner and Wright, 1983).

Las primeras tres divisiones del embrión se denomina desarrollo (clivaje), tal es así que hasta 8 células se les denomina estados de desarrollo (cleavage), durante estas etapas el embrión decrece en peso (Seidel, 1991). Durante el estado de mórula, las células embrionarias cambian de formas esféricas a poligonales (este fenómeno se denomina compactación). Durante la compactación, uniones especializadas hacen que las células se pueden comunicar con otras. La compactación es un excelente signo de que los embriones están desarrollando normalmente; la pérdida de compactación a 6 días después del estro en vacunos indica desarrollo retardado (Seidel, 1991).

La mórula en desarrollo, internamente forma una cavidad (blastocelo) por gasto de energía al bombear líquido entre las células. La formación del blastocisto, también es indicativo de continuidad de desarrollo normal del embrión. La no formación de blastocelo a 7-8 días después del estro, significa desarrollo retardado (Seidel, 1991).

La zona pelúcida es una capsula similar a la gelatina que rodea al ovocito y al embrión temprano, estos tienen receptores de esperma que son inactivados después de la fecundación y mantiene las células de los embriones pre compactados, y protegen estas células jóvenes del sistema inmune y los patógenos. Si la zona pelúcida es retirada de embriones pre-compactados, las células llegan a separarse del embrión y degeneran. Cuando el blastocelo crece muy grande, el embrión se expande (8 a 9 días después del estro) y la zona pelúcida se adelgaza, este estado se denomina blastocisto expandido. Después, un día más, la expansión es tan grande que la zona pelúcida se rompe y el embrión sale afuera (prolapso), quizás ayudado por enzimas. Los embriones prolapsados, día 11 a 13, adquiere la forma elíptica y luego se va alargando y al día 17 a 19 el embrión se alarga lo suficiente como para ocupar los dos cuernos (Seidel, 1991)

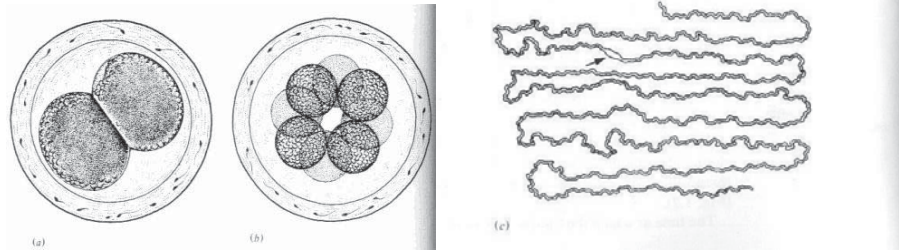


Figura 02: Estadios de embriones post fertilización: a) embrión de cerdo (18h post ovulación), b) embrión de cerdo de 8 células (55h post ovulación) c) embrión de cerdo 13 días post ovulación (157 cm de elongación) (Austin and Short, 1982)

Los embriones protruidos hacen más difícil la identificación. La zona pelúcida es una estructura por el cual se puede identificar los embriones a temprana edad. Los embriones mantiene su forma esférica hasta aproximadamente el día 12 cuando se inicia la elongación (Shea, 1981).

El código de la etapa de desarrollo es numérico, en un rango de “1” (un ovocito infertilizado o u embrión de 1-célula) a “9” (blastocisto expandido eclosionado). El código de calidad del embrión es también numérico y se basa en la integridad morfológica de los embriones. Los códigos de calidad de los embriones oscilan entre 1 y 4 (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, 2011):

- **Código 1: Excelente.** Masa embrionaria simétrica y esférica con blastómeros individuales (células) que son uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión concuerda con la etapa de desarrollo esperada. Las irregularidades deben ser relativamente menores, y al menos 85% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable. Este criterio debe basarse en el porcentaje de células embrionarias representadas por el material extrudido en el espacio perivitelino. La zona pelúcida debe ser suave y no debe tener superficies cóncavas o planas que puedan provocar que el embrión se adhiera a una placa de Petri o a una pajuela.

- **Código 2: Bueno.** Irregularidades moderadas en la forma total de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable.
- **Código 3: Malo.** Irregularidades importantes en la forma total de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable.
- **Código 4: Muerto o Deteriorado.** Embriones, ovocitos o embriones de 1 célula deteriorados: no validos

El código de los estadios de desarrollo es numérico de 1 a 9. En la transferencia comercial de embriones, los embriones son generalmente recolectados en los días 6 a 8 del ciclo estral (de mórula a blastocisto) (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, 2011):

- N° 1: ovocito sin fertilizar o embrión de una célula (1 día).
- N°2: Identifica embriones con dos a 16 células (2 a 4 días).
- N°3: Identifica Mórulas Tempranas (5 a 6 días).
- N°4: Identifica Mórulas Compactas de 6 días de edad.
- N°5: Blastocisto Temprano (7 días).
- N°6: Blastocisto (7 a 8 días).
- N°7: Blastocisto Expandido (8 a 9 días).
- N°8: Blastocisto eclosionado (9 días) apartir del día noveno o decimo el blastocisto ya está fuera de la zona pelucida.

La determinación de la calidad del embrión permite caracterizar en términos (más o menos) cuantitativos las posibilidades de desarrollo y posterior nacimiento a partir de un embrión obtenido (Palma, 2001)

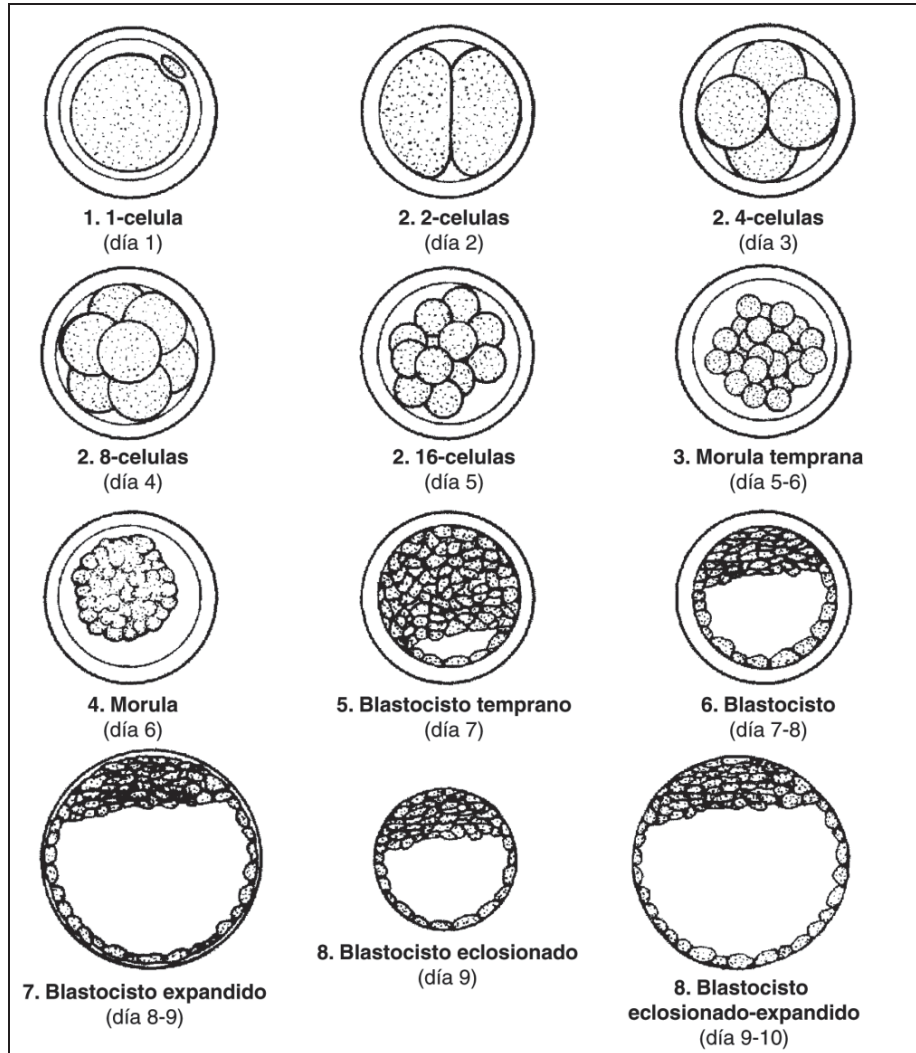


Figura 03: Estadios de desarrollo de embriones (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, 2011).

Los embriones clasificados como I, II y III son aptos de ser transferidos. Los resultados, expresados en porcentaje de gestaciones, varían entre 45 y 60 % y son iguales para los embriones clasificados como excelentes y buenos. Para el congelamiento y micromanipulación solo pueden utilizarse los embriones I y II (De Bem *et al*, 1994).

2.2.1.4. Conservación de los embriones

Si los embriones se van a transferir a vacas o novillas, el mismo día, se pueden conservar en solución recién preparada, estéril, del mismo medio en que se lavaron, durante varias horas, procurando mantener una temperatura próxima a la del cuerpo.

Ahora es posible congelar embriones de vacuno durante mucho tiempo, y obtener con ellos índices de gestaciones superiores al 50%. Los problemas relativos a la congelación de embriones son similares a los de la congelación del semen, excepto que aquellos son más sensibles a los procesos de congelación descongelación y no pueden tolerar mermas. Al igual que para los espermatozoides se utiliza a menudo la glicerina como sustancia crioprotectora. Los embriones se suelen conservar aislados en pajuelas de 0.25 ml, iguales que las utilizadas en inseminación artificial. Se introducen en nitrógeno líquido para congelarlos a ritmo controlado, utilizando para ello una maquina computarizada. (Peters y Ball, 1991)

Existe además la conservación “sin equilibrio” o vitrificación. Este congelamiento rápido (vitrificación) consiste en deshidratar al embrión a temperatura ambiente a través de un medio de vitrificación de muy alta concentración y un congelamiento muy rápido, que evita la formación de cristales de hielo, lo cual permite que la solución cambie del estado líquido a un estado vidrioso. La solución de vitrificación de baja toxicidad (EFS 40) consta de tres agentes crioprotectores: un agente de poca toxicidad y penetración rápida, p.ej., glicol de etileno a 40%; una macromolecula, p.ej. Ficoll a 18 % y un disacárido, p.ej., 0.3 M de sucrosa. La exposición breve a temperatura ambiente para la solución de blastocistos de ganado (1 min), es necesario antes de la inmersión en nitrógeno líquido (Hafez, 2000).

2.2.1.5. Transferencia de Embriones

La transferencia no quirúrgica de embriones se realiza a través de la cérvix, con equipo similar al que se utilizan en inseminación artificial y con una técnica muy similar, excepto en que hay que tomar mayores precauciones para no contaminar la pistola a su paso por la vagina. El embrión se deposita en el útero dentro del cuerno ipsilateral al ovario en que se produjo la ovulación (Peters y Ball, 1991).

En el método transcervical, se palpa a la receptora a través del recto para determinar si el ovario contiene el cuerpo lúteo. A continuación se aplica anestesia epidural posterior para evitar que la vaca se mueva o golpee con la cola durante el procedimiento. Previamente en condiciones asépticas, se aloja el embrión en una pajuela de 0.25 ml y se introduce en una pistola de transferencia, la cual se cubre con una funda esterilizada. La pistola se introduce en la vagina y se hace pasar a través del cuello uterino por manipulación rectal, y se guía hacia el cuerno uterino que se encuentra en dirección ipsilateral con respecto al cuerpo lúteo. En ese momento se deposita el contenido de la pajilla en el cuerno uterino (Hafez, 2000).

2.2.2. Fecundación *in vitro*

La aplicación de los procedimientos de producción *in vitro* (PIV) en la reproducción bovina se han incrementado en los últimos años y en un futuro pueden llegar a ser utilizados en programas de gran escala de producción comercial. Dentro de éste concepto, la recolección de ovocitos es un paso necesario para poder llegar a establecer estos programas de PIV.

Embriones de valor comercial o de alto valor genético pueden ser obtenidos de animales recién sacrificados o de animales genéticamente valiosos. Para poder llegar a obtener los embriones *in vitro*, se hace necesario recuperar los ovocitos y finalizar 3 procesos biológicos: maduración, fecundación de los ovocitos y los cigotos resultantes

desarrollarlos hasta el estado de blastocisto en donde pueden ser congelados o transferidos a receptoras sincronizadas.

Los ovarios contienen un elevado número de folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo (primordiales, en crecimiento, atrésicos) de los cuales, solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas naturales se tornarían en folículos atrésicos (Gordon, and Lu, 1990).

2.3. Importancia de la tecnología de producción de embriones.

2.3.1. Mejoramiento genético

La tasa anual de ganancia genética se determina por el efecto de los siguientes factores (Lohuis, 1995):

- La intensidad de selección, depende de la proporción de la población que es seleccionada como padres de la siguiente generación. Una pequeña proporción de los mejores animales, no dará una alta intensidad de selección.
- La exactitud de selección, depende de los métodos usados para identificar los animales superiores y mide el grado de coincidencia entre nuestra estimación del índice de valor genético de una animal y la actual habilidad genética de la característica en cuestión.
- La heredabilidad de la característica, es la proporción de la variabilidad total e la producción observada entre individuos que es debido a efecto de genes aditivos, por lo tanto puede ser transmisible de una generación a otra. Una alta variabilidad, facilita el progreso genético. La heredabilidad es prácticamente una medida de la variabilidad genética.
- El intervalo entre generaciones, la media de edad de los padres cuando la cría nace. A mayor edad de los padres el progreso genético es menor.

La influencia de estos factores en ganancia genética por año se combina en la siguiente ecuación (Lohuis, 1995):

$$\text{Ganancia Genética/año} = \frac{\text{Intensidad de selec.} \times \text{exactitud selecc.} \times \text{variabilidad genética (h}^2\text{)}}{\text{Intervalo entre generaciones}}$$

El tipo de tecnología reproductiva que escojamos para multiplicar los individuos seleccionados en la población, podría afectar los factores que influyen la ganancia genética y determinar la tasa a la cual queremos incrementar la frecuencia de los genes deseables en la población (Lohuis, 1995).

El uso de inseminación artificial (IA) con semen de toros con prueba de progenie resulta en una ganancia genética promedio en producción de leche de 1,0 – 1,5% sobre el promedio por año. Una simulación computarizada, predice una tasa de ganancia genética de 8-9,5% más alta que un actual programa de prueba de progenie, cuando la múltiple ovulación y transferencia de embriones (MOET) se incluye en un programa de prueba de progenie. El incremento de ganancia genética por año es aún más alta (22% más alta que la ganancia genética con actual prueba de progenie) cuando se produce embriones *in vitro* de donadoras jóvenes (terneras de 1 a 5 meses de edad) (Lohuis, 1995).

Nicholas and Smith (1983) estima que la tasa de ganancia genética en ganado lechero podría ser incrementado en un 100% por el uso de transferencia de embriones en la generación de hembras de reemplazo.

2.3.2. Eficiencia reproductiva.

En la actualidad la producción de embriones por MOET implica:

- La necesidad de tratamiento hormonal de las donadoras, para estimular al desarrollo y maduración simultaneo de varios folículos y la inducción de ovulación múltiple.

- La necesidad de realizar múltiples más de una inseminación de la donadora durante el celo inducido, para asegurar la fecundación de todos los ovocitos.
- La necesidad de sincronizar el estro entre la donadora y la receptora.
- La colección (lavado) de embriones del útero de la vaca donadora, alrededor de 7 días post inseminación.

En promedio, con MOET se puede producir 5 a 6 embriones viables por lavado y 5 a 7 lavados por año (si la donadora solo se usa para producir embriones) y con una tasa de preñez promedio de 58- 60%. Esto da un promedio de 20 a 24 crías producidas por donadora/año (Lohuis, 1995)

Las ventajas de la tecnología *in vitro* sobre el sistema MOET incluye:

- No necesita tratamiento hormonal de donadoras sexualmente maduras. Los ovocitos son recuperados directamente de los ovarios donde los folículos desarrollan constantemente de primordiales a estados maduros, a través de las ondas foliculares (Driancourt *et al.*, 1991).
- La frecuencia de colección de ovocitos con Ovum Pick Up (OPU) puede ser aproximadamente 2 veces por semana sin tratamiento hormonal, si se realiza tratamiento superestimulante la frecuencia de colección se reduce a una vez por semana. Los tratamientos hormonales son requeridos cuando se trabaja con donadoras jóvenes peri puberales (Presicce *et al.*, 1993).
- Los ovocitos pueden ser recuperados de ovarios de camal, esto da la posibilidad de rescatar material genético de alto valor, cuando estos animales tienen que ser beneficiados. Esto abre la posibilidad de producir embriones de razas de carne o de cruces especiales determinados por el mercado, utilizando ovarios de camal en gran escala y a costos relativamente bajos (Penny *et al.*, 1995).
- Animales de alto valor genético y que son infértiles (que no sean razones genéticas), pueden ser rescatadas para la producción de embriones. Muchos problemas de fertilidad son relacionados con fallas en la ovulación, daños en el útero y oviducto, vejez, etc. (Hasler *et al.*, 1995).

- OPU es posible realizar en animales gestantes, después del primer trimestre de gestación, lo cual incrementa la recuperación de ovocitos.
- El semen puede ser usado más eficientemente. En MOET normalmente se usa dos o más dosis de semen (cada una contiene 2 a 10 millones de espermatozoides) con un requerimiento por fecundación en promedio de seis ovocitos (0.3-1.5 millones de esperma por ovocito). Para fecundación *in vitro* (FIV) se usa una tasa de 6,000 a 10,000 espermatozoides por ovocito (Gordon, 1994).

La eficiencia de la producción de embriones *in vitro* en términos de crías obtenidas, varía grandemente de acuerdo a varios factores: edad, tipo de donadora, método de recuperación de ovocitos, frecuencia de OPU, condición corporal y estatus nutricional de la donadora, estado fisiológico de la donadora, raza, habilidad de la fecundación de los espermatozoides del toro, el método de producción *in vitro* aplicado, etc.

De esta manera por FIV se puede producir más crías por donadora/año. Asumiendo la capacidad promedio de 0,8 crías/ semana y un total de 42 crías / año, versus 20 a 24 crías obtenidas por MOET. Yang (2003) afirma que vía OPU, potencialmente una donadora valiosa (vaca) podría producir 15 a 20 ovocitos por semana (2 veces por semana de 7 a 10 colecciones por colección) o cerca de 700 a 1000 ovocitos por donadora/año. Asumiendo un 30% de tasa de blastocistos y 40% de tasa de preñez, una vaca potencialmente puede dar 200 a 300 blastocistos o 80 a 120 preñeces por año.

2.4. Factores que afectan la superovulación de donadoras

Mapletoft *et al.*, (2002) afirman que la variabilidad de la respuesta superovulatoria continua siendo uno de los problemas a veces frustrantes en la transferencia de embriones en vacunos. La obtención de LH de los extractos de pituitaria ha tendido a reducir la variabilidad, como el de pituitaria porcina purificada.

La mayor fuente de variabilidad en vacas es el estatus de los folículos ováricos y el tiempo de inicio del tratamiento gonadotropico. Drianourt (2001) afirma que la respuesta ovárica de cada hembra depende del número de folículos gonado-sensitivos presentes en el momento de iniciar el tratamiento. Iniciar el tratamiento al momento de la emergencia de la onda folicular, trae muchos beneficios.

Incorporar técnicas diseñadas para controlar la dinámica de la onda folicular tales como ablación folicular o tratamientos con estradiol /progesterona, estos tienden a reducir la variabilidad causada por tratamiento gonadotropico de vacas en diferentes estados de desarrollo folicular y mejorando la respuesta por ventajas en los mecanismos de reclutamiento y selección de folículos (Mapletoft *et al.*, 2002).

2.4.1. Estado del ovario en el momento del tratamiento

Los folículos formados durante la gestación, continúan su desarrollo a preantrales (primarios o secundarios) y antrales, siguiendo luego la atresia. Una mayoría de estos folículos se encuentran en los ovarios entre los días 0 – 5 y 9 -13 del ciclo estral (Palma, 2000).

Lindsell *et al.* (1985) observaron una mejor tasa de recuperación de embriones transferibles de donadoras que iniciaron tratamiento de estimulación durante los días 6 a 9 del ciclo estral (ver tabla 1). Otro trabajo similar realizado por Bulbul *et al.* (2010) recomienda iniciar el tratamiento de superovulación durante la mitad del ciclo, en los días 8-12, logrando una mayor respuesta de embriones transferibles.

Cuadro 02: Producción de embriones a diferentes días del ciclo estral en vaquillas. (Lindsell *et al.*, 1985).

Día del ciclo estral	CL palpados $\bar{X} \pm DS$	Ovocitos y embriones recolectados $\bar{X} \pm DS$	Embriones transferibles $\bar{X} \pm DS$
3	9,3±2,0 ^b	10,0 ±2,4	2,7±1,3
6	11,0±2,4 ^{a b}	11,0 ±2,6	4,3±2,1
9	16,0±1,2 ^a	17,0±3,0	7,2±1,4
12	12,6±2,4 ^{ab}	11,7± 3,9	3,9±2,0

Los valores con letras diferentes dentro de una misma columna difieren estadísticamente ($p < 0,05$)

Bo *et al.* (2011) recomienda que los protocolos de superovulación se deben iniciar en la fase luteal media, aproximadamente entre el día 9 y 11 después del celo. Esto, corresponde al inicio de segunda onda folicular (días 9 y 10 del ciclo). Sin embargo, también sostiene que es importante sincronizar la superestimulación con la emergencia de la onda folicular, siendo el inicio de la superovulación, entre el día 1 o 2 días de la emergencia folicular.

Adams (1999) indica que la emergencia de las ondas foliculares se caracteriza por el crecimiento (de 1 a 2 días) de 20 pequeños folículos, que inicialmente son detectados por ultrasonografía a un diámetro de 3 a 4 mm de diámetro. La primera onda folicular ocurre consistentemente en el día de la ovulación (día 0), emergiendo la segunda onda entre el día 9 a 10 (para ondas de tres ciclos) y entre día 8 a 9 (ciclos de tres ondas), estas últimas la emergencia de la tercera onda ocurre en el día 15 a 16. El cuerpo lúteo inicia regresión tempranamente en ciclos de 2 ondas (día 16) que en ciclos de 3 ondas (día 19) dando como resultado ciclos estrales cortos (19 días vs 23 días).

Garzon *et al.* (2007) indican que para una mejor respuesta a la superovulación, los programas deben iniciarse al comienzo de una nueva onda folicular, antes de la selección del folículo dominante. La respuesta superovulatoria es significativamente mayor cuando los tratamientos se inician el día antes o el día del inicio de la onda folicular (ya sea la primera o segunda onda) que los tratamientos iniciados uno o dos días después.

2.4.2. Edad de las donadoras

El número de embriones transferibles obtenidos por Hasler *et al.* (1981) en donantes cuyas edades estaban comprendidas entre 3 y 6 años (7,1 embriones) resultó mayor que el que reportó en vaquillas (4,3 embriones) y primíparas (4,7 embriones). Por su parte Hanselman (1995) efectuó un estudio retrospectivo en el que analizó la respuesta superovulatoria agrupando en tres categorías, hasta 5, 5 a 8 y más de 8 años y el promedio de embriones transferibles fue 5,2; 6,0 y 3,2, respectivamente.

Lerner *et al.* (1986) observaron que hay una interacción entre la edad de la donante y la dosis de gonadotropina. Observaron que al aumentar la edad de la donante, disminuyó el número de ovulaciones, tasa de fecundación y la calidad embrionaria; la reducción del número de ovulaciones se debería a una menor disponibilidad de folículos capaces de responder a las gonadotropinas exógenas. Al haber menos folículos en crecimiento los niveles de inhibina se reducen y habría un aumento de FSH endógeno que haría que estos animales, en cualquier momento del ciclo estral, los folículos en crecimiento estuvieran en estado de desarrollo más avanzado que aquellos folículos en animales más jóvenes. Esta alta exposición de estradiol podría ser la causa de la disminución en la tasa de fertilización y la calidad embrionaria.

Palomino (2000) sostiene que la mayor respuesta superovulatoria se ha conseguido en animales jóvenes. Estos animales de calidad, provienen de progenitores de alto valor genético y productivo, que pueden incorporarse al sistema de transferencia de embriones como donantes antes de hacerlo a la reproducción normal, reduciendo de esa manera el intervalo generacional y alargándose su periodo reproductivo del animal joven. Estas hembras producirán hijos mejoradores antes de que entren en su periodo reproductivo normal y produzcan una primera gestación y parto.

Silva *et al.* (2009) reportan una menor producción de embriones en vacas de mayor edad y puede estar relacionada con los cambios foliculares y endocrinos que ocurren a medida que aumenta la edad. Aunque el patrón de onda folicular en animales de más edad es similar a la de las vacas jóvenes, las vacas viejas tienen menos folículos ováricos reclutados en una onda folicular, y tienen un menor número de folículos grandes después de superestimulación ovárica.

2.4.3. Estado nutricional

La importancia de la nutrición en hembras tratadas, debe asumirse que el nivel de energía de la ración puede influir tanto en las tasas de ovulación y fecundación como en la viabilidad de los embriones (Palma, 2000).

Kruse *et al.* (2013) sostiene que la condición corporal de las donantes no influyó en la puntuación global de la calidad del embrión, pero afectó el número de embriones transferibles recogidos de 82.6 % a 65.8 %, comparando vacas de buena condición corporal con baja condición. Por lo tanto, cuando se usa protocolos de múltiple ovulación en los protocolos de transferencia de embriones, es fundamental contar con vacas con buena condición corporal, para aumentar número de embriones transferibles.

Hanselman (1995) demostró que la respuesta superovulatoria se correlaciona positivamente con la condición corporal, observando además que las donantes en sistemas extensivos tuvieron 2, 2 embriones transferibles más que las estabuladas.

2.4.4. Historial reproductivo

Deben considerarse dos situaciones diferentes, por un lado, la transferencia de embriones ha demostrado ser una técnica alternativa útil para el diagnóstico y tratamiento de aquellos casos en que la infertilidad no se deba a factores intrínsecos del embrión sino al ambiente uterino o algún otro factor materno. Los problemas de fertilidad incluyen anomalías detectadas a la palpación y otras no detectadas como obstrucción oviductales (Palma, 2000).

Existen estudios en los que se observó claramente que las donantes que ingresan a programas de transferencia de embriones con antecedentes de infertilidad tienen una producción que donantes consideradas fértiles. Hasler *et al.* (1981) demostraron que en donantes infértiles el número de embriones transferibles (2,0 vs 6,0) es menor y que los porcentajes de preñez en receptoras (58 vs 68%) son más bajos en comparación a embriones provenientes de donadoras fértiles (ver tabla 3).

Cuadro 03: Comparación de las tasas de producción de embriones de vacas fértiles o infértiles (Hasler *et al.*, 1981)

	Fértiles	Infértiles
N	666	318
Fertilización	66	42%*
Embriones/ donante	6,4	2,4*
Donante sin embriones (%)	14	51*
Tasa de preñez	68	58*

2.4.5. Tratamientos sucesivos

La mayoría de autores coinciden que en que la respuesta superovulatoria disminuye con los tratamientos sucesivos; para lograr mejores resultados, las donantes deben de tener como mínimo un descanso de dos ciclos entre cada tratamiento de superovulación (Palma; 2000)

Vacas repetidamente superovuladas con 60 a 90 días de intervalo en un año, no se encontro diferencias en la respuesta superovulatoria entre extractos de pituitaria (Folltropin®-V o FSH-P) y eCG con o sin anticuerpo monoclonal a eCG (Neutra-PMSG; Intervet, Boxmeer, Holland) administrada al momento de realizar la primera inseminación (Mapletoft *et al.*, 1990), mientras que otros favorecen a Folltropin®-V y eCG con Neutra-PMSG.

Mapletoft *et al.* (2002) concluyeron que no hay evidencia de efecto adverso del tratamiento o repetición en el tratamiento de vacas donadoras con Folltropin®-V, en la performance reproductiva, producción de embriones y nacimiento de crías. Hasler, (2000) superovulo vacas Angus primíparas durante 18 meses y fueron superovuladas en promedio 13,8 veces, el número de embriones en promedio fue de 5,5 y tuvo baja variabilidad.

2.4.6. Raza

Martínez *et al.* (1995), utilizaron 100 donadoras de las razas Holstein Friesian y Pardo Suizo Americano, de las cuales 60 fueron vacas de primera recolección posparto y 40 vaquillas de primera recolección. En cada grupo existió un número similar de animales de cada raza. Un primer análisis mostró que no hubo diferencias ($p < 0.05$) entre razas.

Tribulo *et al.* (2010) demostraron en tres razas de ganado de carne (Angus, Brangus, Bonsmara y Braford), obtuvieron en promedio 6.4 embriones viables, no habiendo diferencia entre las razas.

Dominguez *et al.* (2010) comparando producción de embriones viables durante las diferentes estaciones del año en vacas Holstein en la zona del altiplano central de México, tuvieron un promedio de 7.5 +/- 1.3 embriones viables. Demczuk *et al.* (1998), en una investigación utilizando ganado Simmental en la región de Paraná y Matogroso obtuvieron un promedio de 9.8 +/- 6.5 embriones viables por donadora.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación.

El presente trabajo se realizó en el establo La Molina, perteneciente a la Universidad Nacional Agraria La Molina, el cual se encuentra ubicado en el distrito de La Molina, provincia y departamento de Lima. Presenta una temperatura media de 18 grados centígrados con una humedad relativa de 75 % promedio.

3.2 Animales

Los animales en estudio son criados bajo el sistema de manejo intensivo, en corrales donde son ubicados según edad, estado fisiológico, desarrollo corporal y nivel de producción de leche.

Se utilizaron 65 vacas para superovulación y colecta de embriones de tres razas; de los cuales 15 fueron Holstein, 22 Brown Swiss y 28 Fleckvieh durante el año 2012. Los animales son puros de pedigrí, registrados en la asociación respectiva de la raza, cumpliendo con las características genéticas y anatómicas propias de cada raza.

Para la elección de los animales se tomaron en cuenta los criterios de inclusión:

- Condición corporal ≥ 2.75 y ≤ 4 en la escala que va de 1 a 5.
- No haber presentado durante el periodo del puerperio, algún trastorno como retención de placenta, piómetra, endometritis.
- Producción de crías superior a la media del hato.
- Presentar un buen historial reproductivo: no más de 2 servicios por concepción, no tener historias de abortos.
- A la palpación rectal, presentar los órganos reproductivos en buen estado, cuernos simétricos, cérvix recta y sobre el piso de la pelvis.

3.3 Manejo de animales

La dieta de los animales es formulada de acuerdo a los requerimientos para cada etapa de desarrollo y producción de leche. Las vacas de producción reciben alimentación fraccionada a base de forraje fresco (maíz chala picada), alimento balanceado (concentrado) según el nivel de producción y también orujo de cervecería. La ración es repartida por separado, primero el forraje, luego el concentrado y el orujo de cervecería, para las vacas en producción la ración se fracciona en cuatro partes durante el día.

El sistema de ordeño es mecánico, en una sala tipo Tándem, en tres turnos; uno por la mañana, otro en la tarde y el tercero en la noche.

Las técnicas reproductivas empleadas son la inseminación artificial y transferencia de embriones, a celo visto, sincronización de celo o detectado mediante el uso de podómetros. Se usa pajillas de semen convencional y sexado de toros importados de Norteamérica y Europa. Las vaquillas reciben el primer servicio de inseminación artificial usando semen sexado y en caso haya seguido servicio semen convencional. En vacas solo semen convencional. Para la transferencia de embriones se realiza 7 días después de detectado el celo del animal (celo natural o sincronizado).

En el aspecto sanitario, los animales se encuentran libres de enfermedades infectocontagiosas, ya que cuenta con cronograma de vacunación contra aftosa y carbonosa, y pruebas rutinarias para Brucella y tuberculosis. Los animales enfermos con alguna infección bacteriana son aislados y tratados hasta su recuperación. Las principales enfermedades presentes son la mastitis y la metritis.

Para el manejo de registros se utiliza el software ganadero Dairy Plan, donde son registrados todos los eventos (detección de celo, inseminación artificial, partos, tratamientos sanitarios, abortos, muertes, ventas, etc.), que durante el día son anotados en cuadernos de campos, para luego descargarlos en sus respectivos ficheros para procesarlos y ser analizados.

3.4 Materiales y Equipos utilizados.

3.4.1 Superovulacion e inseminación artificial.

Para el programa de superovulacion e inseminación se emplearon los siguientes equipos, materiales, vitaminas y hormonas.

Equipos y Materiales	Hormonas y Vitaminas
Equipo de ultrasonido	Dispositivo Intravaginal Bovino (1g de progesterona)
Jeringas y agujas descartables	Progestin® (Progesterona Inyectable)
Guantes plástico de palpación	Catosal® (Vitaminas inyectables)
Papel toalla	Estrovet® (Benzoato de Estradiol)
Pistola de inseminación	Lutaprost® (Prostaglandina)
Funda de inseminación	Conceptase® (Gonadotropina (GnRh))
Semen bovino.	Folltropin®-V (FSH)

3.4.2 Colecta de embriones.

En la colecta de embriones se utilizaron los siguientes materiales y equipos.

Materiales y Equipos	Hormonas y Medios de lavado
Equipo de ultrasonido	Medio de lavado de embriones
Baño María	Suero Fisiológico
Dilatador	Lidocaína® 1%
Estilete	Lutaprost® (Prostaglandina)
Pinzas	
Cateter Folley	
Tubería Y	
Filtros Ecom	
Jeringas y agujas	
Guantes Plásticos de palpación	
Papel Toalla	

3.4.3 Búsqueda y clasificación de embriones.

En la búsqueda y clasificación de embriones se emplearon los siguientes

Materiales Físicos	Medios de conservación de embriones
Estereoscopio	Medio de Lavado
Microscopio	Suero Fisiológico
Baño María	Holding®
Platina Caliente	Etilenglicol Freezer®
Filtros Ecom	
Placas Pेत्रri	
Jeringas y agujas	
Micro pipeta	
Pajillas 0.25 ml	
Papel Toalla	

3.5 Sincronización y superovulación de donantes.

El protocolo utilizado para la superovulación de los animales fue en base a las siguientes hormonas: Progesterona (DIB®: Dispositivo Intravaginal Bovino, Syntex, Argentina) y Progestin®), Prostaglandinas (Lutaprost®, Agrovét Market, Perú), Estrógenos (Estrovet®, Montana, Perú), FSH (Folltropin®-V, Bioniche, Canadá) y GnRh (Conceptase®, Agrovét Market, Perú).

El esquema de tiempo y aplicación de hormonas empleado en la superovulación fue el siguiente:

Día 0: Se realiza el implante intravaginal de un DIB® (Progesterona), aplicación intramuscular profunda de 0.35 ml de Estrovet® (Benzoato de Estradiol), 1.5 ml de Lutaprost® (Prostaglandina), 1ml de Progestin® (Progesterona) y un suplemento de vitaminas ADE (Catosal®).

Día 4 al 7: se aplica el Folltropin®-V (FSH) por la mañana y por la tarde cada día (intervalo de 12 horas). La dosis por donadora, varía según historial de respuesta ovulatoria individual.

Día 7: se aplica dos dosis de Lutaprost®, 2.0 ml en la mañana y 12 horas después en la tarde 2.0 ml en segunda aplicación.

Día 9: se observa la presencia de celo y se aplica 2.5 ml de Conceptase® (GnRH); se realiza doble inseminación artificial (12 y 24 horas de detectado el celo), aplicación de 2.5 ml de Conceptase® (GnRH) en la primera inseminación.

Día 16: se realiza la colecta, transferencia y congelamiento de embriones. Al final del lavado aplicación 2 ml de Lutaprost® (Prostaglandina).

En la siguiente figura se observa el esquema de aplicación del protocolo realizados a las vacas del estudio:

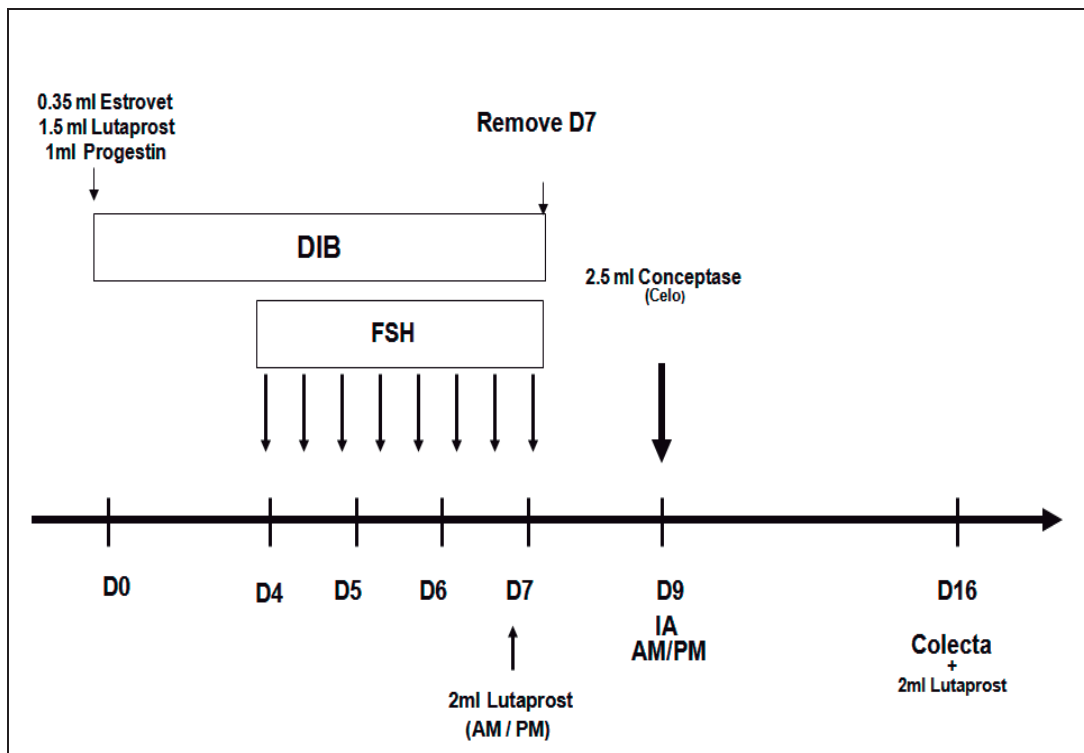


Figura 04: Esquema de aplicación del protocolo de superovulación.

La dosis de FSH se reguló de acuerdo a la respuesta individual de cada animal, encontrando las mejores respuestas a niveles que van de 320 mg a 360 mg, teniendo un

promedio de uso de 340 mg, el cual se empleo en la superovulación de los animales en estudio.

En la siguiente figura se muestra el protocolo de superovulación empleado.

Donadora a 340 mg FSH		
Día	a.m.	p.m.
0	Colocar DIB® + 0.35 ml Estrovet® + 1.5 ml Lutaprost® + 1 ml Progestin® + 5.0 ml Catosal®	
1		
2		
3		
4	3.5 ml Folltropin®-V(70 mg FSH)	3.0 ml Folltropin®-V 60 mg FSH
5	3.0 ml Folltropin®-V (60 mg FSH)	2.5 ml Folltropin®-V (50 mg FSH)
6	2.0 ml Folltropin®-V (40 mg FSH)	1.5 ml Folltropin®-V (30 mg FSH)
7	1.0 ml Folltropin®-V (20 mg FSH) + 2 ml Lutaprost®	0.5 ml Folltropin®-V (10 mg FSH) + 2 ml Lutaprost
8		
9	Al Celo 2.5 ml Concepatse® (IA 12 y 24 h)	Al Celo 2.5 ml Concepatse® (IA 12 y 24 h)
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16	Colecta - transferencia y congelacion de embriones + 2 ml Lutaprost®	

Figura 05: Protocolo utilizado para donadora a 340 mg de FSH

3.6 Colección, búsqueda y clasificación de embriones.

Se procedió a verificar la respuesta ovárica a la superovulación en las vacas atreves de una ecografía a cada vaca, y determinar el cuerno que se lavara en primer lugar.

Para la recolección de los embriones se utilizó la metodología del circuito cerrado con flujo discontinuo. Las vacas fueron llevadas al brete de colecta el cual cuenta con un desnivel que coloca a la vaca con los miembros anteriores más elevados que los posteriores lo que facilita la ubicación del aparato reproductor y la evacuación del medio de lavado.

Una vez sujetas las vacas, primero se procedió al lavado de la región perineal y a la aplicación de un anestésico local vía epidural, administrando 5 ml de lidocaína 1%, para disminuir los movimientos peristálticos del recto, y facilite la manipulación de los cuernos uterinos evitando al mismo tiempo irritar la mucosa del recto. Se introdujo el dilatador de cérvix, para facilitar la entrada del catéter Folley hacia los cuernos uterinos.

Se procede a la ubicación del catéter de dos vías (22Fr 30cc), que lleva en su interior un estilete que le da rigidez para poder ser ubicado en el cuerno correspondiente al ovario con mayor cantidad de cuerpos lúteos, con una jeringa llena de medio de lavado se infla el balón del cateter para poder fijarlo a la pared del cuerno (10-15ml). Una vez fijado, se retira el estilete y se conecta a uno de los lados de la tubería en “Y”.

El otro lado de la tubería en “Y” se conecta al medio de lavado (Lactato Ringer enriquecido con Suero fetal bovino) y en el otro por debajo del nivel de la línea del cateter al filtro donde se reciben los embriones.

El medio de lavado se va introduciendo por una de las vías de la tubería en promedio de 50-60 ml, a 38°C, paralelamente se hacen masajes en el cuerno uterino lo que favorece que los embriones se suelten y se puedan recuperar. Por la segunda vía de la tubería se recogen los 60 ml introducidos que van a dar al filtro. Se utilizaron 1000 ml por cada cuerno.

Terminado el proceso de lavado, los filtros que contienen el medio de colecta y los embriones, son llevados al laboratorio evitando la incidencia de luz solar y se procede a la búsqueda de los embriones, de acuerdo al siguiente protocolo:

- Dejar reposar el colector (filtro) mínimo 5-10 minutos a 37° C.
- Lavar el filtro con medio de lavado y depositar el líquido en placas petri cuadrículadas.
- Ubicar los embriones en las Placa Petri con fondo cuadrículado con la ayuda de un microscopio con 10-20X.
- Utilizar micropipetas para la manipulación.
- Revisar cada placa dos veces.
- Mover la placa petri para evitar que los embriones se peguen a los bordes.

Los códigos de calidad de los embriones oscilan entre 1 y 4 (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, 2011):

- **Código 1: Excelente.** Masa embrionaria simétrica y esférica con blastómeros individuales (células) uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión concuerda con la etapa de desarrollo esperada. Las irregularidades deben ser relativamente menores, y al menos 85% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable. Este criterio debe basarse en el porcentaje de células embrionarias representadas por el material extrudido en el espacio perivitelino. La zona pelúcida debe ser suave y no debe tener superficies cóncavas o planas que puedan provocar que el embrión se adhiera a una placa de Petri o a una pajueta.
- **Código 2: Buena.** Irregularidades moderadas en la forma total de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable.

- **Código 3: Mala.** Irregularidades importantes en la forma total de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable.
- **Código 4: Muerta o Deteriorada.** Embriones, ovocitos o embriones de 1 célula deteriorados: no validos

El código de los estadios de desarrollo es numérico de 1 a 9. En la transferencia comercial de embriones, los embriones son generalmente recolectados en los días 6 a 8 del ciclo estral (de mórula a blastocisto) (Sociedad Internacional de transferencia de Embriones, 2011):

- N° 1: ovocito sin fertilizar o embrión de una célula (1 día).
- N°2: Identifica embriones con dos a 16 células (2 a 4 días).
- N°3: Identifica Mórulas Tempranas (5 a 6 días).
- N°4: Identifica Mórulas Compactas de 6 días de edad.
- N°5: Blastocisto Temprano (7 días).
- N°6: Blastocisto (7 a 8 días).
- N°7: Blastocisto Expandido (8 a 9 días).
- N°8: Blastocisto eclosionado (9 días) apartir del día noveno o decimo el blastocisto ya está fuera de la zona pelucida.

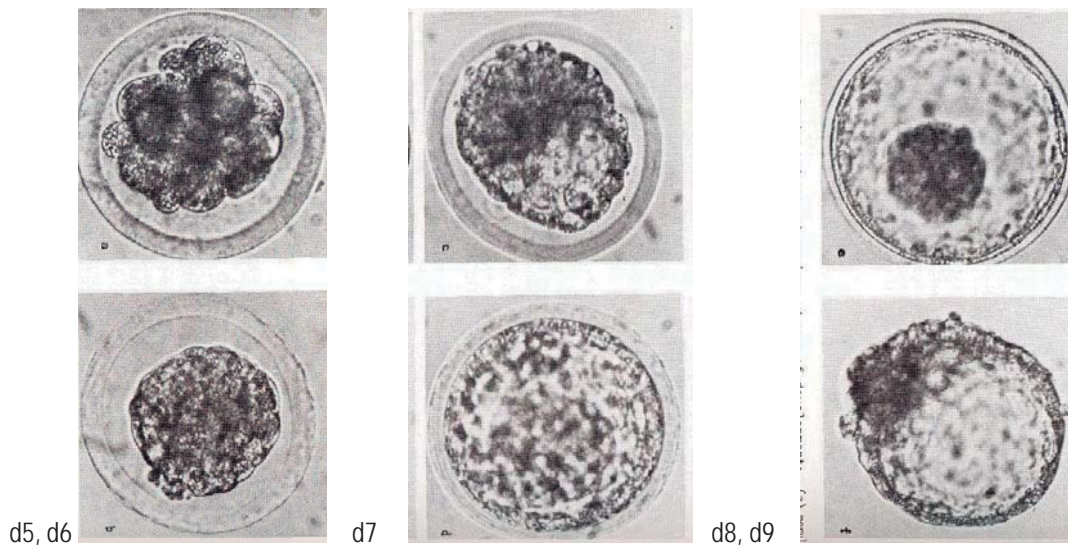


Figura 06: Embriones bovinos en diferentes estados de desarrollo (460X), (Lindner and Wright, 1983)

A medida que los embriones fueron localizados, se depositaron en placas Petri conteniendo medio de mantenimiento a 37°C, a medida que se fueron pasando de un pozo a otro, se fueron clasificando, para lo cual se utilizó los criterios del Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Los diferentes grados de calidad fueron determinados por medio del microscopio, tanto la observación como la diferenciación entre un grado y otro son subjetivas y depende en gran parte de la experiencia del operador.

Una vez clasificados los embriones fueron transferidos en fresco o congelados; la preparación de las pajuelas de 0.25 ml se realizó con medio de mantenimiento y etilenglicol como se indica en la figura:

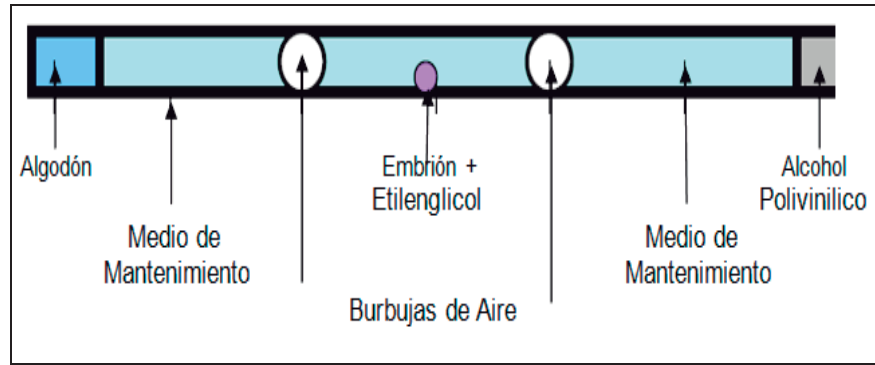
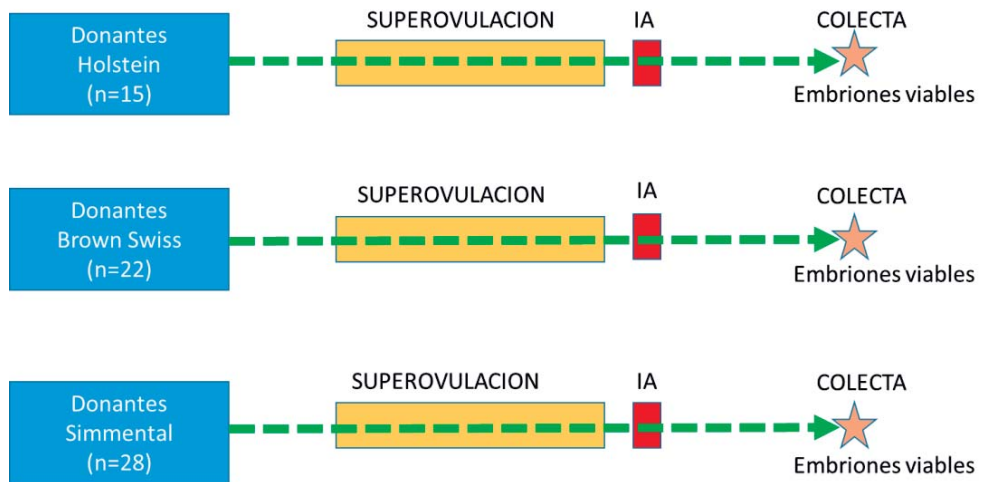


Figura 07. Representación esquemática de una pajilla con un embrión congelado.

3.7 Diseño experimental



3.8 Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el diseño estadístico Diseño Completamente al Azar, cuyo modelo lineal es:

$$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = variable respuesta correspondiente al número de embriones viables totales.

μ = media general.

T_i = efecto del i ésimo tratamiento (Razas)

E_{ij} = efecto del error del muestreo

Las medias fueron realizadas usando la prueba de Dunnett ($\alpha = 0.01$). Se utilizó el paquete estadístico Statical Analisis Sistem (SAS versión 9.2), para los análisis de variancia y comparación de medias.

IV. RESULTADOS

En la Unidad Experimental de Zootecnia “Renato Zepilli Ferraza” se realizaron doce colectas con un promedio de cinco donadoras por colecta, durante el año 2012 y podemos observar los siguientes resultados. El número de embriones viables recolectados de las 65 donadoras fue de 252, de los cuales 46 se transfirieron en fresco y 206 fueron congelados.

El promedio obtenido fue de 3.9 ± 0.9 embriones viables por donadora; estos datos concuerdan con los reportados por Borjas *et al* (1993), quienes obtuvieron un promedio de 3.3 embriones quienes realizaron comparación de producción de embriones en 50 donadoras de dos razas de ganado lechero (Holstein y Brown Swiss).

En cambio Betancourth *et al* (2011), utilizando similar protocolo en Honduras, trabajando con 10 donadoras de tres razas de ganado lechero obtuvieron 6.5 embriones (Holstein, Brown Swiss y Jersey). Esta investigación realizado en ganado manejado en un sistema al pastoreo, donde podría asumirse por el nivel de exigencia de los animales en este sistema, se obtuvo una mejor tasa de recuperación de embriones comparado en los sistemas intensivos donde son más exigidos a la producción y el número de donadoras con las que se trabajo.

Tabla 04: Embriones viables totales de las tres razas y número de embriones por vaca.

DONADORAS	TOTAL EMBRIONES VIABLES	N°
N°	N°	Emb./Donadora
65	252	3.9 ± 0.9

El porcentaje de embriones viables de las tres razas es de 52.8% (n=252) de un total de 477 recuperados durante todo el periodo de evaluación y 47.2% (n=225) de ovocitos no fertilizados, degenerados y embriones de baja calidad que fueron descartados (figura 6).

Estos datos nos muestran que son más altos a los reportados por Jiménez (2009), donde reporta un porcentaje de embriones viables de 47.8 % (n=5), posiblemente al número pequeño de muestra con la que trabajaron en esta investigación, pero son más bajo al reportado por Rosell *et al.* (2003), en ganado lechero encontraron 67 % de tasa de recuperación de embriones transferibles, bajo un sistema semi-intensivo, lo cual explicaría el porcentaje más alto que nuestra investigación, pues son animales con un nivel de exigencia productiva más baja.

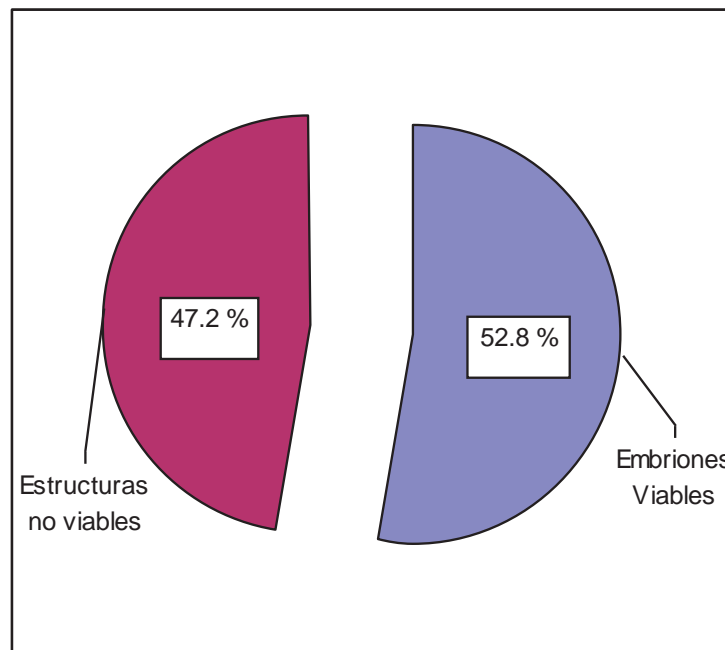


Figura 08: Distribución de estructuras recuperadas por colecta.

La respuesta individual de embriones viables por raza fue la siguiente:

Para la raza Holstein fue de 72 embriones, de los cuales 4 fueron transferidos en fresco y 68 embriones fueron congelados; siendo el promedio de 4.8 ± 1.2 embriones viables por donadora.

Este valor es parecido al reportado por Rengifo (2009), donde encontró 5.4 embriones para 15 vaquillonas Holstein con celo natural, pero en el caso de celo sincronizado

reporto 1.2 embriones en 13 vaquillas siendo este inferior al encontrado en nuestra investigación, este dato debido a que no hubo una adecuada sincronía de la ovulación con el momento de la inseminación a tiempo fijo. Asimismo, Rivadeneira y Alvarado (2005), trabajando con cuatro vaquillas Holstein en un establo lechero comercial en Lima, utilizando en protocolo de sincronización con Folltropin obtuvieron un promedio de 6.25 embriones viales por donadora, este valor es más alto al reportado en nuestra investigación debido al bajo número de animales muestreados con los que se trabajó.

Los embriones viables en la raza Brown Swiss fueron 78 embriones, de los cuales 11 se transfirieron en fresco y 67 se congelaron; siendo el promedio de 3.5 ± 0.96 embriones viables por donadora. Bulbul *et al.* (2005), trabajando dos tratamientos de superovulación en 19 vacas Brown Swiss bajo un manejo de sistema intensivo, encontrando valores promedios de 4.5-4.7 embriones con media de $\pm 1.0 - 1.6$, siendo estos valores similares a los reportados en nuestra investigación. Asimismo Díaz *et al.* (2012), trabajando en condiciones de trópico, obteniendo un promedio de 8.4 embriones viables, este resultado más alto debido al sistema de crianza donde el nivel de exigencia de los animales es bajo comparado con los sistemas intensivos.

La respuesta de la raza Fleckvieh fue de 102 embriones viables, de los cuales 31 embriones se transfirieron en fresco y 71 se congelaron; los embriones viables por vaca donadora fueron en promedio 3.6 ± 0.8 . Carballo *et al.* (2010), usando dos protocolos de sincronización de superovulación con GnRH y Benzoato de estradiol más progesterona, obtuvieron un promedio de 7.7 y 6.8 embriones respectivamente. Asimismo Demczuk *et al.* (1998), en ganado Simmental obtuvieron un promedio de 9.8 ± 6.5 embriones viables por donadora.

Las diferencias observadas al tipo de ganado y la procedencia de estas líneas de Fleckvieh/Simmental, lo que este pudo interaccionar en la producción de embriones, siendo en nuestro caso la línea con tendencia para la producción de leche, que es la más exigente que las de tipo cárnico, habiendo logrado una mejor respuesta a la tasa de recuperación de embriones viables por donadora.

Cuadro 05: Embriones viables por raza y número de embriones por raza.

DONADORA	TOTAL EMBRIONES VIABLES		N°
RAZA	N°	N°	Emb./Vaca
HOLSTEIN	15	72	4.8 ^a ± 1.2
BROWN SWISS	22	78	3.5 ^a ± 0.9
SIMMENTAL	28	102	3.6 ^a ± 0.8

Nota: Medias con letras iguales no muestran diferencia significativa.

Al realizar las pruebas de medias para la producción de embriones por razas prueba de Dunnett ($\alpha=0.01$), no se encontró diferencia significativa en la producción de embriones viables medida entre las tres razas (4.8^a, 3.5^a y 3.6^a), por lo que podemos afirmar que no hay efecto de la raza en la recuperación de embriones viables para nuestro estudio. Esto concuerda con lo reportado por Borjas *et al* (1993), donde en su investigación no encontraron diferencias entre donadoras de raza Holstein y Brown Swiss.

También es similar a los resultados obtenidos por Díaz *et al* (2012), en su trabajo comparando entre raza Holstein y Brown Swiss, donde no encontraron diferencias significativas en la producción de embriones viables.

V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones del experimento podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. La respuesta a la tasa de recuperación para las razas Holstein, Brown Swiss y Fleckvieh de embriones viables obtenidos mediante el método MOET es en promedio por colecta de 3.9 ± 0.9 embriones. Obteniendo un porcentaje de embriones viables por colecta de 52.8 %
2. El promedio de embriones por colecta obtenido por raza en presente estudio fueron: Holstein 4.8 ± 1.2 , Brown Swiss 3.5 ± 0.9 y Fleckvieh 3.6 ± 0.8 de embriones viables.
3. A la evaluación estadística no existe diferencia significativa para las medias de la producción de embriones viables entre las razas evaluadas, siendo para nuestro medio de manejo los factores fisiológicos individuales y niveles de exigencia productivos, propia de la hembra donante principalmente los cuales pueden variar la tasa de ovulatoria y la tasa de recuperación de embriones viables.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar más trabajos con un mayor número de animales para determinar la cantidad y calidad de embriones producidos por MOET en las donadoras de las diferentes razas que se explotan en los diversos sistemas de producción del país.
2. Investigar la producción de embriones en vaquillas y vacas de razas especializadas para la producción de leche, para evaluar cantidad y calidad, para determinar cuál es la más económica.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS G.P., 1999 Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants, J. Reprod. Fertil. Suppl. 54 (1999) 17–32.
- ALBERIO R.H. 2003. Nuevas Biotecnología reproductivas. Aspectos biológicos y económicos. Boletín INTA Balcarce, 28pp
- AUSTIN C.R. AND SHORT R.V. 1982 Reproduction in mammals. Book 2: Embryonic and fetal development. Second edition. University Cambridge.
- BERADEN H.J. y FUQUAY W.J. 1992. Reproducción Animal Aplicada. Editorial El Manual Moderno, S.A. México. 205p.
- BETANCOURHT J. F. y GUTIERREZ G.C. 2011. Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales. Honduras. Disponible en ITF (<http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/82/1/T3185.pdf>). Accesado el 15 Junio 2013.
- BO, G.A.; CARBALLO G.; TRIBULO, A.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R. y MAPLETOFT, R.J. 2011. Nuevos tratamientos hormonales para la superovulación de donantes de embriones bovinos. Taurus, Bs. As., 13(50):4-25. Argentina.2011.
- BULBUL B., KIRBAS M., KOSE M., DURSUN S. 2010. Investigation of Superovulation Response in Brown Swiss Cows After Synchronization Using Progesterone and Oestradiol Valerate. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 10 (3): 463-468, Turquia.2010.
- BUXADE C. 1995. Zootecnia Bases de Producción Animal. Tomo II: Reproducción y Alimentación. Grupo Mundi-Prensa. México. 116-117p.
- CALLEJAS SANTIAGO. 2004. Control Farmacologico del ciclo estral bovino: Bases fisiológicas, Protocolos y Resultados. Taurus Bs. As., 6(24):22-34. Argentina. 2004.
- DEMCZUK E; KOZICKI L; PONTELLI E; SALLES J. 1998. Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato

Grosso do Sul. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 35, n. 4, p. 174-177, Brazil. 1998.

- DIAZ N.R., RENGIFO G.O. y ALMEYDA M.A. 2012. Técnica de multiovlacion y transferencia de embriones de Ganado bovino en condiciones de trópico del Perú. Revista Institucional Agro Innova. Ministerio de Agricultura del Perú. Año 3 Edicion 13. Pag 18-23.
- DIAZ THAIS. 1999. Dinámica del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral en el bovino. Rev. Fac. Cienc. Vets. UCV 40(1): 3-18. Venezuela. 1999.
- DOMINGUEZ R.R., ASPRON L. M., VASQUEZ P.C., GONZALES P.E., ARECHIGA F.C. (2010). Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. Rev Mex Cienc Pecu 2010,1(3):189 – 203. Mexico. 2010.
- E.S.E. HAFEZ y B. HAFEZ. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Séptima Edición. Mc Graw-Hill Interamericana. México. 126-127,435, 444p.
- FERNANDEZ SANCHEZ, MANUEL. (2008). El ciclo estral de la vaca. Diagnostico fotografico. Servet, Diseño y Comunicacion S.L. España. 15p.
- GARZON N., URREGO R., GIRALDO C. (2007). Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulacion en la transferencia de embriones bovinos. Revista CES. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Volumen 2. Número 2. Julio – Diciembre de 2007. ISSN 1900-9607. España.
- GORDON I, 1994. Laboratory production of cattle embryos. Biotechnology in Agriculture Vol. II. CAB International, UK.
- GORDON I, AND LU H. 1990 Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology 33:77-87. 1990.
- HANSELMAN D. (1995) Was beeinflusst den Erfolg bei der superovulation. Tierzuchter. 8:28-29
- HASLER J., BROOKE G. AND MC CAULEY A. 1981 The relationship between age and response to superovulation in Holstein cow and heifers . Theriogenology 15: 109-126

- HASLER JF, HENDERSON WB, HURTGEN PJ, JIM ZQ, MCCAULEY AD, MOWER SA, NEELY B, SHUEY LS, STOKES JE, TRIMMER SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152.
- I.E.T.S. 2011. MANUAL DE LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES. Una guía de procedimientos e información general sobre el uso de tecnología para la transferencia de embriones que enfatiza sobre los procedimientos sanitarios. 2011. Cuarta Edición. International Embryo Transfer Society. USA. 57-58, 155-158p.
- KANAGAWA H. 1988 Bovine embryo transfer. Japan International Cooperation Agency. 168 pp.
- KRUSE S.G., BIRD S., FUNELL B., Y BRIDGES G. 2013. Effect of change of body condition score of donor and recipient on cows reproductive performance. University of Minnesota Beef Research Report Publication BR-1302. Disponible en ITF (http://www.mnbeef.umn.edu/research_reports/2013/BR%201302-ruse.pdf) Accesado el 17 Junio 2013.
- LINDNER G.M. AND WRIGTH R.W. 1983 Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20(4): 407-416.
- LINDSELL C.E., MURPHY B.D. , MAPLETOFT R.J. 1985. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* :Volume 26, Issue 2, August 1986, Pages 209–219p.
- LOHUIS MM, 1995. Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programmes. *Theriogenology* 43: 51-60
- MAPLETOFT R.J., PAWLYSHYN V., GARCIA A., BO G.A., WILLMOTT N., SAUNDERS J., SCHMUTZ S., 1990 Comparison of four different gonadotropin treatments for inducing superovulation in cows with 1:29 translocation, *Theriogenology* 33: 282.
- MAPLETOFT RJ, STEWARD KB, ADAMS GP. 2002 Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev*. 2002 Nov-Dec;42(6):601-11.

- MARTINEZ B S, SANCHEZ P A, ANTA J E, BERRUECOS V J, VALENCIA MJ. 1995. Valoración de dos hormonas foliculo estimulantes comerciales usadas en la superovulación de vacas en lactación y vaquillas en ganado lechero. Tec. Pecu. Mex. Vol. 33 No.1. Mexico. 1995.
- MOTTA D.P., RAMOS C. N., GONZALES S.C., CASTRO R.E. 2011. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. Vet.zootec. 5 (2): 88-99. Chile. 2011.
- MUNAR C. 2003. Control de calidad en un programa de transferencias embrionarias a campo en Argentina: método, factores y resultados. Boletín Técnico Munar Asociados, 10pp
- NICHOLAS FW, SMITH C, 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. Anim. Prod. 36: 341- 353.
- PALMA G. A. 2001. Biotecnología de la Reproducción. Minera El Paraíso S.A. Argentina. 79,125,127p
- PALOMINO H.M. 2000. Biotecnología del Trasplante y micromanipulación de embriones de Bovinos y Camélidos de los Andes. A.F.A. Editores Importadores S.A. Perú. 35,99,120,169-170p.
- PENNY CD, LOWMAN BG, SCOTT NA, SCOTT PR, VOELKEL S, DAVIES DAR, 1995. Management aspects of induced twinning in beef suckler cows using in vitro fertilised embryos. Veterinary Record 136: 506-510
- PETERS A. R. y BALL J.P.H. 1991. Reproducción del Ganado Vacuno. Editorial ACRIBIA S.A. España. 178 - 183p.
- PRESICCE GA, JIANG S, SINKIN M, YANG X, 1993. Oocyte quality and embryo development in prepubertal calves. Biology of Reproduction, Vol. 52: 127.
- RATO M., CEBALLOS-MARQUEZ A., MATMOROS R., WITTWER F., BOHMWALD H., WOLTER M. 2008. Suplementación con selenio, respuesta superovulatoria y recuperación de embriones en bovinos lecheros tratados con ECG. Vet.zootec. 2(2): 53-58. Chile. 2008.
- RENGIFO O. (2009). Comparación de dos protocolos de superovulación en vaquillas Holstein en condiciones de trópico. Lima-Perú. Pag 29.

- RIVADENERA V. y ALAVARADO E. 2005, Evaluación de dos protocolos de superovulación para producción de embriones In Vivo en vaquillonas Holstein. SPERMOVA. Lima-Perú. 2012; 2 (1):55-56.
- ROBERT DE BEM A., RUMPF R. y VIEIRA DE SOUSA R. 1994 Serie Manual N°3-94. Tecnología de Embriones Bovinos: Un Instrumento de Mejoramiento Genético Animal. Instituto Nacional de Investigación Agraria-Dirección General de Investigación Agraria. Lima-Perú. 37-40p.
- ROSELL P.R., RODRIGUEZ B.R., GRIMON F.M. y MIRANDA M.G. 2003. Eficiencia de la transferencia de embrione. Revista Electrónica Granma Ciencia. Vol.7, No.1, Enero-Abril del 2003. ISSN 1027-975X. Cuba.
- SEIDEL G. E. Jr. 1991 Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal Production and Health. Paper 77.pp 164.
- SHEA B.F. 1981 Evaluating the bovine embryo. Theriogenology. 15(1): 31-35
- SILVA J.C.C., ALVAREZ R.H., ZANENGA C.A., PEREIRA G.T.2009. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. Anim. Reprod., 6 (.3), p.440-445. Brazil.
- SZABARI M., PINNYEY S., BOROS N., SEBESTYEN J., RETTER Z., BAKOS G., BOKOR A., STEFLER J. 2008. Some factors affect of embryo-flushing in dairy cattle. Acta Agraria Kaposváriensis 12 (1): 113-120. Cuba. 2008.
- TOVIA L. N., DUICA A.A. 2012. Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. Spei Domus 8 (17):38-47. Colombia. 2012.
- Willett, E.L., Black, W.C., Casida, L.E., Stone, W.H., Buckner, P.J. 1951. Successful Transplantation of a Fertilized Bovine Ovum. Science 113 (2931):247
- YANG X. 2003 Advanced transgenesis and cloning: Genetic Manipulation in Animals. Electronic Workshop Presentation: *Paper No. 22* Chemistry and Life Sciences Office (CLSO).
- ZIZLAVSKY J., RIHA J., MACHAL L., Y STIPKOVA M., 2002. Production of embryos from repeated superovulations of cows during one calving interval. Czech J. Anim. Sci., 47 (3): 92–97. Republica Checa. 2002.

VIII. ANEXO

Formatos de colecta y conservacion de embriones

A. CERTIFICATE OF EMBRYO RECOVERY

Page ___ of ___

Breed _____

Donor Name _____ No. _____ CC _____ Ear Tag or Tattoo _____

Owner _____ Address _____

Onset AM
Estrus Date _____ PM
Yr. Mo. Day

Service Sire _____ No. _____ CC _____ Breeding Date _____
Yr. Mo. Day

ID Code _____ Freeze Date or Batch No. _____ Sexed Semen X or Y Recovery Date _____
Yr. Mo. Day

Service Sire _____ No. _____ CC _____ Total Recovered _____
No. Cleaved/Degen. _____

ID Code _____ Freeze Date or Batch No. _____ Sexed Semen X or Y No. Unfertilized _____
No. Transferred _____
No. Frozen _____

Signature _____ Firm _____ ET Code _____
Practitioner or Leader of the Embryo Production Team Recovering Embryos

B. CERTIFICATE OF EMBRYO TRANSFER (see reverse side for coding instructions)

IF FROZEN

ACCOMMODATES DIRECT TRANSFER

Date of Embryo Transfer _____ Surgical _____ Non-surgical _____ Other _____ Freeze Date on straw _____
If all trans. Yr. Mo. Day Practitioner I.D. _____
at one time Straw No.'s _____

Days since Estrus of Donor _____

One Embryo was transferred to each of the following recipients unless it is noted that more than one was transferred.

RECIPIENT IDENTIFICATION		Breed Code	Days Since Estrus	Stage Code	Qual. Code	Embryo Manipulated N, D, F, M or U	Straw No.	Emb. Trans. Date	Comments*
1.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
2.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
3.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
4.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
5.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
6.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
7.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
8.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
9.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
10.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
11.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
12.	_____			<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			

Signature _____ Firm _____
Technician/Practitioner or Team Leader that transferred the Embryos

ET Code _____ Phone () _____

*Use comment column for any special notations and/or identify the location of the opposite half of a divided embryo. Pregnancy can be noted.

CONDITIONS FOR COMPLETING EMBRYO CERTIFICATES

- A. Complete one or more Certificate of Embryo Recovery for each recovery. Precede registration numbers of donor dam and donor sire(s) with the International Standards Organization (ISO) three letter country codes (cc). The responsible practitioner or leader of embryo production team signing this certificate is attesting to the fact that the donor dam was identified with her certificate of registration, that the service sire information was taken from a written record of services, and that all the information is true and correct.
- B. Certificate of Embryo Transfer will be completed to the extent that is necessary and/or appropriate to identify each recipient into which an embryo is transferred. If frozen embryos are transferred, the Certificate of Embryo Recovery will be completed by the responsible practitioner or by transferring from the original Certificate of Embryo Recovery or by attaching a copy. The practitioner or leader of embryo production team signing the Certificate of Embryo Transfer is attesting to the accuracy and completeness of the identification of the embryos being transferred and the identity of the recipients into which the embryos are being transferred. Days since estrus will be expressed in 1/2 day increments.

One copy of a complete Certificate of Embryo Transfer with Certificate of Embryo Recovery will be submitted to the appropriate breed office as required by the respective breed organization, which may require the record before resulting offspring can be registered or officially identified. One copy should be provided to the owner.

Should any embryo in a recipient as identified hereon change ownership, it is important that the requirements of the respective breed organization for recording the identification of the new owner be followed. This may be required before resulting offspring can be registered or officially identified. This would normally be the responsibility of the owner of record.

Use the following codes to describe the embryo, identify the breed and identify the month in all dates.

STAGE OF DEVELOPMENT		QUALITY OF EMBRYOS	MANIPULATION OF EMBRYOS	January	JA
No.	Stage	Code 1. Excellent or Good	N - Not Manipulated	February	FE
1	Unfertilized	Code 2. Fair	D - Divided	March	MR
2	2- to 12-cell	Code 3. Poor	F - Female by Biopsy	April	AP
3	Early Morula	Code 4. Dead or degenerating	M - Male by Biopsy	May	MY
4	Morula		U - Sex Undetermined by Biopsy	June	JN
5	Early Blastocyst	Refer to IETS Manual, Third Edition, Chapter 9, for description of codes.	Use comment column to describe other biopsies.	July	JY
6	Blastocyst			August	AU
7	Expanded Blastocyst			September	SE
8	Hatched Blastocyst			October	OC
9	Expanded Hatched Blastocyst			November	NO
				December	DE
			SEXED SEMEN		
			X - Female Y - Male		

BOVINE

AN - Aberdeen Angus	BZ - Bonsmara	GS - Gascone	MR - Marchigiana	RO - Rotbunte
AB - Abundance	CP - Campine Red Pied	GV - Galvish	ME - Maremmana	SA - Salers
AF - Afrkaner	CN - Canadienne	GI - Gir	MI - Meuse Rhine Issel	SG - Santa Gertrudis
AK - Arkiole	CB - Chartmoy	GR - Groninger	MO - Montbeliard	SE - Senapol
AY - Ayrshire	CH - Chamblais	GU - Guernsey	MG - Murray Grey	MS - Shorthorn (milking)
BA - Barzona	CA - Chianina	GZ - Guzema	NE - Nelore	SS - Shorthorn (beef - Scotch)
BE - Beafalo	DB - Danish Black & White	HC - Hays Converter	NG - Nguni	SP - Shorthorn (polled)
BF - Beef Friesian	DJ - Danish Jersey	HH - Hereford (horned)	NM - Normande	IS - Shorthorn (Hawara)
BM - Beefmaster	RW - Danish Red & White	HP - Hereford (polled)	NR - Norwegian Red	SI - Simbrah
BB - Belgian Blue	DE - Devon	SH - Highland (Scotch Highland)	PA - Parthenais	SM - Simmental
BG - Belted Galloway	DR - Dexter	HO - Holstein	PI - Piedmont	DS - South Devon
BD - Blonde D'Aquitaine	DZ - Donskoberger	HY - Hybrid (Alberta Hybrid)	PR - Plo Rouge	SX - Sussex
BX - Boran	FP - East Friesian Red Pied	IB - Itage	PZ - Pinzgauer	TA - Tarentaise
BO - Bralord	ER - Erlinger	IN - Indu Brasil	RA - Ranger	TG - Tasmanian Grey
BR - Brahman	FA - Flamand	JE - Jersey	AR - Red Angus	TL - Texas Longhorn
BH - Brahmanal	FL - Fleckvieh	KB - Kobe (Wagyu)	RB - Red Brangus	TU - Tuli
BL - Braier	FR - Fribourg	LU - Luing	RD - Red Dane (Red Danish, Danish Red)	WB - Welsh Black
BN - Brangus	FB - Friesian (Belgian)	LM - Limousin	WW - Red Holstein	WF - West Friesian Red
BU - Braunvieh	DF - Friesian (Dutch)	LR - Lincoln Red	RP - Red Poll	XX - Crossbreds
BS - Brown Swiss (beef)	GA - Galloway (beef)	MA - Maine-Anjou		
BS - Brown Swiss (dairy)	GD - Galloway (dairy)			

CAPRINE

AL - Alpine	AG - Angora	CH - Cashmere	KR - Kalahari Kids	NU - Nubian
TO - Toggenburg	SA - Saanen	BG - Boer	LN - La Mancha	SG - Savanna Goat

EQUINE

AS - American Saddlebred	CL - Clydesdale	MN - Morgan	QH - Quarter Horse	SF - Suffolk Punch
AP - Appaloosa	HA - Hackney (Horse)	PL - Palomino	SE - Shetland	TW - Tennessee Walking
AB - Arabian	HK - Hackney (Pony)	PE - Percheron	SI - Shire	TH - Thoroughbred
BL - Belgian	HU - Hunter	PN - Pinto	SN - Standardbred	WE - Welsh

PORCINE

YO - Yorkshire	DU - Duroc	BK - Berkshire	PE - Pietrain	LW - Large White (British)
LA - Landrace	LC - Lacombe	SO - Spotted	TM - Tamworth	LB - Large Black (British)
HA - Hampshire	PC - Poland China	CW - Chester White	WS - Wesssex Saddleback	

OVINE

AN - Afrino	DM - Dohne Merino	IL - Ile de France	OX - Oxford	MM - S. African Mutton Merino
BP - Blackhead Persian	DO - Donsel	LE - Leicester	SP - Persian (Spotted/Selder)	ST - Southdown
BC - Border Cheviot	DR - Dorper	LJ - Lincoln	RA - Rambouillet	SU - Suffolk
CO - Columbia	DP - Dorper	ME - Merino	RM - Romnalet	VR - Van Rooy
CR - Comedale	FN - Finnish Landrace	MT - Montadale	SB - Scottish Blackface	WD - White Dorper
DA - Damara	HA - Hampshire	NC - N. Country Cheviot	SR - Shropshire	



Universidad Nacional Agraria La Molina
 Facultad de Zootecnia, Departamento de Producción Animal
 Laboratorio de Biotecnología Reproductiva – LBR
 Telf.:51.1.3498085; email: emellisho@lamolina.edu.pe
jbarreraamaro@gmail.com



DONADORA

Nombre: _____ R.G.: _____ Arete: _____
 F.N.: _____ Parto: _____
 D.E.L.: _____ Prom D.: _____
 Ultimo celo: _____ N° IA p/ SO: _____

TORO (SEMEN):

Nombre: _____ **R.G.:** _____

DATOS DE LA MOET:

CELO (hora/día): _____ N° de Servicios: _____

COLECCIÓN (fecha).

PALPACION/ULTRASONOGRAFIA

OVARIO IZQUIERDO	
F: _____	C.L.: _____

OVARIO DERECHO	
F: _____	C.L.: _____

EVALUACION

	CALIDAD \ ESTADO							TOTAL DE EMBRIONES	
	1	2	3	4	5	6	7		
1								CONGELABLES	0
2								TRANSFERIBLES	0
3								VIABLES	0
4									
TOTAL									

OBSERVACIONES:

