



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

AREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

NIVEL DE POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRIA EN PRODUCCION ANIMAL

Mención Producción de Rumiantes

TITULO: EVALUACIÓN A NIVEL DE GANADO TIPO CARNE
(CHAROLAISE) Y DE GANADO TIPO LECHE (BROWN SWISS) DE
DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE
EMBRIONES EN LA REGIÓN AMAZÓNICA SUR DEL ECUADOR
(RAESUR)

TESIS DE POSTGRADO PREVIA A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER
SCIETAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL

AUTOR:

ING. CARLOS TEODORO ARÉVALO SANMARTÍN.

DIRECTORA:

DR. EDGAR LENIN AGUIRRE RIOFRÍO, MG.SC.

LOJA - ECUADOR
2014

“ EVALUACIÓN A NIVEL DE GANADO TIPO CARNE (CHAROLAISE) Y DE GANADO TIPO LECHE (BROWN SWISS) DE DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN LA REGIÓN AMAZÓNICA SUR DEL ECUADOR (RAESUR).”

TESIS DE POSTGRADO PRESENTADA AL TRIBUNAL DE GRADO COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGISTER SCIENTAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL

APROBADA:



Handwritten signature in blue ink, appearing to read 'H. Castillo', written over a horizontal line.

DR. HECTOR CASTILLO, Mg.Sc.

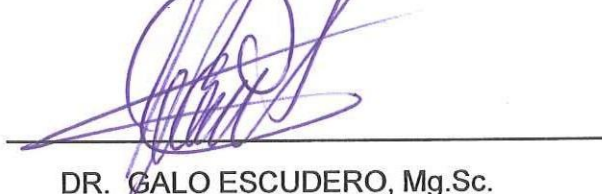
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Vicente Cevallos', written over a horizontal line.

DR. VICENTE CEVALLOS, Mg.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Galo Escudero', written over a horizontal line.

DR. GALO ESCUDERO, Mg.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN


Dr. Edgar Lenin Aguirre Riofrío, Mg.Sc.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de Tesis de Grado titulada "EVALUACIÓN A NIVEL DE GANADO TIPO CARNE (CHAROLAISE) Y DE GANADO TIPO LECHE (BROWN SWISS) DE DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN LA REGIÓN AMAZÓNICA SUR DEL ECUADOR (RAESUR)", de Fuente del señor egresado: Ing. Carlos Teodoro Arévalo Sanmartín, previo a la obtención del Título de MAGISTER SCIENTAE EN PRODUCCION ANIMAL, ha sido prolijamente revisada, por lo que se autoriza su presentación, publicación y difusión.

Loja, 07 de Febrero del 2014



Dr. Edgar Lenin Aguirre Riofrío, Mg.Sc.

DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

Yo, Carlos Teodoro Arévalo Sanmartín, declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Firma: 

Autor: Ing. Carlos Teodoro Arévalo Sanmartín.

CI. 0301207494

Fecha: 12 de febrero de 2014

**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA
CONSULTA, REPRODUCCION PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACION
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.**

Yo Carlos Teodoro Arévalo Sanmartín, declaro ser autor de la tesis titulada: "EVALUACIÓN A NIVEL DE GANADO TIPO CARNE (CHAROLAISE) Y DE GANADO TIPO LECHE (BROWN SWISS) DE DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN LA REGIÓN AMAZÓNICA SUR DEL ECUADOR (RAESUR)", como requisito previo a la obtención del título de: Magister en Producción Animal, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al público la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con los cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los doce días del mes de febrero del dos mil catorce, firma el autor.

Firma:.....

Autor: Ing. Carlos Teodoro. Arévalo Sanmartín

Número de cédula: 0301207494.

Dirección: Avenida 30 de Junio, cantón San Juan Bosco, provincia de Morona Santiago.

Correo electrónico: carlos7311@gmail.com; carlos7311@live.com.

Teléfono: 073042099.

DATOS COMPLEMENTARIOS.

Director de Tesis: Dr. Edgar Lenin Aguirre Riofrío, Mg.Sc.

Tribunal de Grado: Dr. Héctor Castillo, Mg.Sc.

Dr. Vicente Cevallos, Mg.Sc.

Dr. Galo Escudero, Mg.Sc.

AGRADECIMIENTO.

Primeramente quiero agradecer a Dios por la oportunidad que me ha dado de estar en esta tierra y ser instrumento de fe para con los demás, por darme el don del conocimiento para ayudar a mi prójimo a buscar su bienestar.

A mis padres María y Arturo por apoyarme con sus consejos y estimular a seguir estudiando.

A mis hermanos quienes me han apoyado incondicionalmente en la culminación de esta maestría y seguir en el camino del conocimiento.

Al Nivel de Post grado del Área Agropecuaria de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja que me supo recibir con los brazos abiertos para estudiar este postgrado.

Al equipo del CEBIRAE quienes me apoyaron con sus conocimientos y equipos en la realización de esta investigación.

A mis maestros quienes impartieron sus conocimientos y supieron brindarnos lo mejor de ellos, con experiencia, brillantes y sabiduría

A mi Director Dr. Lenin Aguirre quien supo orientarme adecuadamente para llegar a feliz término con esta investigación a pesar de la distancia.

A mis compañero y amigos del postgrado por compartir en las aulas de la Universidad sus conocimientos y brindarme su eterna amistad.

Al pueblo de Loja por ser una gente muy especial que me brindaron su amistad y respeto como solo ellos se caracterizan.

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico con mucho amor a:

Mis padres quienes en todo momento me alentaron a seguir y no darme por vencido en este arduo camino hacia el conocimiento.

A mis hijos Carlos Andrés, María José y Anggie Micaela, a quienes les he pedido prestado el tiempo de compartir y estar felices con ellos, para dedicarme a perseguir mis más anhelados sueños.

A mis hermanos quienes son mi referente a seguir por el camino de la educación y la superación personal.

Especialmente dedico mi trabajo a la memoria del Gran Maestro Dr. Justiniano Crespo que desde el infinito debe estar contento al saber que he seguido las palabras de una promesa de superarme a pesar de las dificultades y obstáculos de la vida.

Carlos T. Arévalo Sanmartín

INDICE

ORDINAL	CONTENIDO	Pagina
	PORTADA	i
	CERTIFICACION DEL TRIBUNAL DE GRADO	ii
	CERTIFICACION DEL DIRECTOR DE LA TESIS	iii
	FUENTE.	iv
	CARTA DE AUTORIZACION DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCION PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACION ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO	v
	AGRADECIMIENTO	vi
	DEDICATORIA	vii
	INDICE	viii
	INDICE DE FIGURAS.	xi
	INDICE DE CUADROS	xii
	RESUMEN	xiii
	ABSTRACT.	xv
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	SUPEROVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.	3
2.2	IMPORTANCIA DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES, APLICACIONES Y PERSPECTIVAS.	5
2.2.1	Ventajas	5
2.3	BASES FISIOLÓGICAS DEL CICLO OVÁRICO (VINCULADO A LA SUPEROVULACIÓN)	7
2.4	ONDAS FOLICULARES	8
2.5	FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS	10

	PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	
2.5.1	Factor Hormona (Droga)	11
2.5.2	Factor Nutrición	11
2.5.3	Factor Raza	12
2.5.4	Factor Edad	13
2.5.5	Factor Clima	13
2.5.6	Factor Protocolo	14
2.5.7	Criterios Generales	14
2.5.8	Criterios Particulares	14
2.5.9	Diferentes Tratamientos de Superovulación de Donadoras	15
2.6	VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA	16
2.6.1	Variabilidad Debida a los Tratamientos Hormonales	17
2.6.1.1	Gonado tropinas empleadas.	17
2.6.1.2	Dosis	18
2.7	NUEVOS TRATAMIENTOS HORMONALES PARA LA SUPEROVULACIÓN DE DONANTES DE EMBRIONES BOVINOS	19
2.8	MANIPULACIÓN DE LA ONDA FOLICULAR PARA LA SUPEROVULACIÓN	20
2.9	ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTOS SUPERESTIMULATORIOS SIN EL USO DE ESTRÓGENOS	24
2.10	TRATAMIENTO PARA DONADORAS BOVINAS APLICADO A NIVEL LOCAL.	27
2.11	COLECCIÓN DE EMBRIONES	29
2.11.1	No quirúrgica	29
2.11.2	Manipulación	31
2.11.3	Necesidades y Acondicionamiento del Laboratorio en Condiciones de un Centro y en Condiciones de Campo	32

2.11.3.1	Condiciones óptimas	32
2.11.3.2	Equipos necesarios	32
2.12	MORFOLOGÍA EMBRIONARIA	33
2.13	CRITERIOS MORFOLÓGICOS	35
3	MATERIALES Y METODOS	36
3.1	MATERIALES	36
3.1.1	Materiales de Oficina	36
3.1.2	Materiales de Campo	36
3.1.3	Materiales de Laboratorio	37
3.2	METODOLOGÍA	38
3.2.1	Descripción del Lugar de la Investigación	38
3.2.1.1	Ubicación de la investigación	38
3.2.1.2	División política administrativa	39
3.2.1.3	Clima	39
3.2.1.4	Precipitación	40
3.2.1.5	Temperatura	40
3.2.1.6	Humedad relativa	40
3.2.2	Ubicación de las Haciendas.	41
3.2.2.1	Hacienda la libertad	41
3.2.2.2	Hacienda el progreso	41
3.2.3	Ubicación del Laboratorio	42
3.2.4	Unidad Experimental	42
3.2.5	Tamaño de la Muestra y Distribución de los Tratamientos	43
3.2.6	Descripción de los Protocolos Empleados	45
3.2.7	Factores que se Evaluaron en la Investigación	46
3.2.8	Diseño Estadístico	47
3.2.9	Metodología de Inicio de la Investigación.	47
3.2.9.1	Ecografía inicial:	47

3.2.9.2	Descripción de los protocolos empleados.	51
3.2.9.3	Inseminación de las donantes	52
3.2.9.4	Recolección de embriones	53
3.2.9.5	Actividades a nivel de campo	53
3.2.9.6	Actividades a nivel de laboratorio.	55
4	RESULTADOS	58
4.1	NUMERO DE ESTRUCTURAS PRESENTES EN LOS OVARIOS MEDIANTE SUPEROVULACIÓN PROGRAMADA.	58
4.2	NÚMERO DE EMBRIONES RECOLECTADOS.	60
4.3	CALIDAD DE EMBRIONES RECOLECTADOS.	62
4.4	NUMERO DE MÓRULAS Y BLASTOCISTOS (CALIDAD 1) PARA CRIOCONGELACIÓN.	63
4.5	COSTOS DE EMBRIÓN CONGELADO Y FRESCO	67
5	DISCUSIÓN	70
5.1	NUMERO DE ESTRUCTURAS (FOLÍCULOS Y CUERPOS LÚTEOS) PRESENTES EN LOS OVARIOS	70
5.2	NÚMERO DE EMBRIONES RECOLECTADOS	71
5.2.1	Calidad de Embriones Recolectados	73
5.3	NUMERO DE MÓRULAS Y BLASTOCITOS (CALIDAD 1) PARA CRIOCONGELACIÓN.	73
5.4	COSTO DE EMBRIÓN CONGELADO Y EN FRESCO.	74
6	CONCLUSIONES	75
7	RECOMENDACIONES	77
8	BIBLIOGRAFÍA	78
9	ANEXOS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	Pagina
1	Esquema de la dinámica folicular en la hembra bovina. Mecanismos de las ondas foliculares	8
2	Protocolo de Sincronización sin estrógenos	22
3	Protocolo de supe estimulación con Estrógenos	27
4	Embriones en diferentes estados de desarrollo	34
5	Estructuras embrionarias	34
6	Ubicación del cantón San Juan Bosco en la región Amazónica	38
7	División política del cantón San Juan Bosco	39
8	Ubicación Geográfica de las haciendas	42
9	Donadoras Charolaise y Brown swiss	43
10	Imágenes ecográficas de ovarios y tracto genital de donadoras al inicio de la Súper ovulación programada (SOP)	49
11	Secuencia del trabajo de campo para la obtención de embriones	55
12	Secuencias de las actividades realizadas en el laboratorio con apoyo de CEBIREA	57
13	Estructuras ováricas presentes en la investigación	59
14	Producción total de embriones obtenidos por tratamientos y razas analizados en la investigación	61
15	Análisis de la calidad de embriones en la investigación	63
16	Análisis de producción de embriones grado 1 para mórulas y blastocistos	65
17	Embriones obtenidos en la investigación	67
18	Análisis de costos de producción de embriones en fresco y congelados	70

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	CONTENIDO	Pagina
1	Descripción detallada del protocolo con estrógenos para superovulación	28
2	Diseño de la Unidad Experimental	44
3	Protocolo convencional para hembras donantes T1	45
4	Protocolo CIDR de 12 días para hembras donantes T2	46
5	Interpretación de las imágenes ecográficas de ovarios y tracto genital de las donadoras al inicio de los tratamientos SOP	50
6	Protocolo convencional para hembras donantes tratamiento1	51
7	Protocolo CIDR 12 días sin estrógenos para hembras donantes tratamiento 2	52
8	Características del semen empleado en la doble inseminación artificial de las donantes	52
9	Numero de estructuras ováricas encontradas en los tratamientos SOP investigados en donadoras Charolaise y Brown Swiss	58
10	Embriones colectados por tratamientos y razas analizados en la investigación	60
11	Calidad de los embriones colectados por tratamiento y razas analizados en la investigación	62
12	Estructuras grado 1 (mórulas y blastocistos), por raza y tratamientos analizados en la presente investigación	64
13	Costos de producción de embriones para ganado Charolaise aplicando los dos tratamientos	68
14	Costos de producción de embriones para ganado Brown swiss aplicando los dos tratamientos	69

RESUMEN

La investigación se realizó en dos fincas ubicadas en el Cantón San Juan Bosco en la provincia de Morona Santiago, sector de la Amazonia Sur del Ecuador. Se evaluó dos protocolos para SOP (superovulación Programada) la unidad experimental fue de 8 lavados de embriones, resultados de dos Razas, dos tratamientos y realizando dos repeticiones en cada nivel, en un diseño 2x2x2, los protocolos fueron probados desde el 19 de abril del 2012 y concluyo el 14 de marzo del 2013, iniciando con el tratamiento del ganado de la raza Charolaise y continuando con las donantes de la raza Brown swiss. En el primer tratamiento las donantes (Convencional) recibieron un CIDR y 2,5 mg de benzoato de estradiol (EB, Grafoleon, Laboratorio Life) y 50 mg de progesterona (P4; Progesterona Gestavec 25 laboratorio Vecol, Colombia) im. Los tratamientos de superestimulación fueron iniciados 4 días más tarde con unidades decrecientes de FSHp (Folltropin-V®, Bioniche) para el caso de las hembras Charolaise se empleó 400 mg de NIH en ocho dosis y para las hembras Brown swiss 400 mg de NIH en ocho dosis. La administración de la PGF2 α el día 6 y 7 (PM, AM), el retiro del CIDR se realizó el día 7 (AM), el tratamiento con GnRH (Fertagyl 2ml, Intervet, Ecuador S.A) se la realizo el día 8 (AM), las Inseminaciones se las realizo el día 8 (PM), día 9 (AM) y la colecta de los embriones a los 7 días de la GnRH (Fertagyl 2ml, Intervet, Ecuador S.A). Para en segundo tratamiento las donantes reciben un dispositivo liberador de progesterona (CIDR) junto con una dosis de PGF2 α (Día -8) y una dosis de GnRH (Fertagyl 2ml, Intervet, Ecuador S.A) 7 días después (Día -1). En el Día 0 (36 h después de la GnRH) se comienza con el tratamiento con FSH en 8 dosis decrecientes administradas cada 12 h y por 4 días como en el protocolo uno. Se administra PGF2 α con las dos últimas inyecciones de FSHp (Folltropin-V®, Bioniche) y se retira el CIDR con la última FSHp (Folltropin-V®, Bioniche). Luego se induce la ovulación con GnRH (Fertagyl 2ml, Intervet, Ecuador S.A) a las 24 h de la remoción del CIDR y las donantes son inseminadas 12 y 24 h después. Los embriones son colectados a los 7 días de la GnRH (Fertagyl 2ml, Intervet, Ecuador S.A). Se realizó el análisis de varianza ANOVA teniendo los

resultados como significativos para estructuras ováricas y embriones obtenidos por tratamiento, de esta experiencia basados en el análisis diremos que el tratamiento dos de CIDR 12 días Sin estrógenos nos reportó mejores resultados con valores promedios de cuerpos lúteos presentes por donante de 13,5 estructuras en ganado Charolaise y 12 cuerpos lúteos promedio en ganado Brown swiss. Los mejores resultados en la producción de embriones resulto ser de igual manera el tratamiento dos CIDR 12 días sin estrógenos produciéndonos un promedio para el ganado Charolaise de 9 embriones por donante y para Brown swiss de 5,5 embriones por donante comparados con los resultados del tratamiento uno que fueron bajos. Los costos más bajos de producción de embriones fue el tratamiento dos CIDR 12 días sin estrógenos con las hembras Charolaise con un costo promedio de embrión en fresco de 219,93 dólares y congelado de 329,12 dólares, en relación con los otros tratamientos y hembras donantes.

ABSTRACT

The research was conducted on two farms in the Canton San Juan Bosco in the province of Morona Santiago , South of the Ecuador Amazon . Two protocols for SOS (Super Ovulation Scheduled) was evaluated experimental unit was 8 washes embryos, results of two races , two treatments, performing two repetitions at each level in a 2x2x2 design, protocols were tested from 19 April 2012 and concluded on March 14, 2013, starting with the treatment of the Charolais cattle breed and continuing donor of Brown swiss breed. In the first treatment the donor (Conventional) received a CIDR and 2.5 mg estradiol benzoate (EB, Grafoleon, Laboratory Life) and 50 mg of progesterone (P4; Progesterone Gestavec 25 Vecol laboratory, Colombia) im. Treatments superstimulation were initiated 4 days later with decreasing units FSHp (Folltropin - V ® , Bioniche) for the case of Charolaise females 400 mg of NIH used in eight doses and for the Brown Swiss 400 mg of NIH females eight doses. Administration of PGF2a on day 6 and 7 (PM, AM), CIDR removal was performed on day 7 (AM), treatment with GnRH (2ml Fertagyl, Intervet, Ecuador SA) was performed on the 8th day (AM), the inseminations were performed the day 8 (PM), day 9 (AM) and the collection of embryos at 7 days of GnRH (2ml Fertagyl, Intervet , Ecuador SA). For the second treatment Donors receive progesterone releasing device (CIDR) along with a dose of PGF2 (Day -8) and a dose of GnRH (2ml Fertagyl, Intervet, Ecuador SA) 7 days after (Day -1). On Day 0 (36 h after GnRH) every 12h and beginning treatment with FSH 8 decreasing doses administered for 4 days and each protocol. PGF2a is given to the last two injections FSHp (Folltropin - V ®, Bioniche) and the CIDR is removed with the last FSHp (Folltropin - V ®, Bioniche). Then induce ovulation with GnRH (2ml Fertagyl, Intervet, Ecuador SA) at 24h after CIDR removal and inseminated donors are 12 and 24 h later. The embryos are collected at 7 days of GnRH (2ml Fertagyl, Intervet, Ecuador SA). The ANOVA results as having significant for ovarian structures and embryos per treatment, this experience based on the analysis we will say that two of CIDR treatment 12 days without estrogen reported us better results with average values of corpora lutea present

was performed 13.5 per donor structures in Charolaise cattle and 12 average corpora lutea in Brown swiss cattle. The best results in the production of embryos proved to be equally CIDR treatment two productcions 12 days without estrogen for an average of 9 Charolais cattle embryos per donor and Brown swiss 5.5 embryos per donor compared with treatment outcomes one were low. The lower costs of production of embryos two CIDR treatment was 12 days without estrogen with Charolaise females with an average cost of fresh embryo frozen \$ 219.93 and \$ 329.12, relative to the other treatments and females donors.

1. INTRODUCCIÓN

El desconocimiento en el medio sobre la transferencia de embriones, así como la eliminación de mitos que sostienen que solo ganaderías bovinas que están cerca de las grandes ciudades pueden tener la facilidad de implementar procesos biotecnológicos, como es la transferencia de embriones, impulsó a plantear esta investigación en la amazonia y con ganado bovino de este lugar o adaptado a las condiciones propias de la Amazonía sur.

La poca información acerca de los efectos de los estrógenos sobre el organismo animal hizo plantear la necesidad de establecer un protocolo diferente en la zona de la amazonia, en el cual se prescinde usar los estrógenos, generando oportunidades para optimizar los recursos de la finca eliminando agentes que puedan afectar a la salud del ser humano en un futuro no muy lejano y generando una tecnología a futuro que ayudara a mejorar los parámetros productivos de las hembras donantes sometidas a superovulación programada.

Para el desarrollo de esta metodología de investigación contó con la asistencia de equipos modernos que ayudaron a establecer diagnósticos aproximados a la realidad, tener diagnósticos exactos, para ello se dispuso dos equipos de ecografía que ayudó a sostener de manera más exacta los diagnósticos de las respuestas a los dos tratamientos.

La investigación sobre respuestas a protocolos bajo situaciones de manejo, condiciones climáticas va aportar radicalmente a la generación de una tecnología propia para la zona, lo cual beneficiará a futuro, por cuanto contribuirá al perfeccionamiento de una metodología apropiada e ira adaptando los protocolos más adecuados para cada raza y tipo de explotación.

Los procesos de extracción de embriones que se empleó en esta investigación están claramente indicados en cada una de sus etapas, considerando aspectos importantes de la investigación como son deformidad de los cuernos uterinos y hembras bovinas con sobrepeso.

En la experimentación se estableció el tipo de equipos según el tamaño de las razas o si es vaca o vacona, los mismos que van directamente relacionados con el tamaño del útero y sus cuernos uterinos para no tener problemas futuros sobre el proceso de lavado.

La comparación de los protocolos en las dos razas tanto en las de carne como en las de leche se pudo establecer diferencias marcadas que ayudó a obtener resultados importantes sobre el establecimiento de esta biotecnología en el medio.

En la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la respuesta en la producción de embriones de dos protocolos propuestos de superovulación en hembras bovinas Charolaise y Brown swiss en el cantón San Juan Bosco de la provincia de Morona Santiago.
- Determinar los costos de producción de un embrión congelado y embrión a ser transferido en fresco, en cada uno de los tratamientos de súper ovulación analizados.
- Socializar los resultados de la investigación a nivel del sector ganadero del Cantón San Juan Bosco, interesado en esta biotecnología reproductiva.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. SUPEROVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La superovulación y transferencia de embriones son biotecnologías que alcanzaron su máximo desarrollo a comienzos de 1980 y que cuentan con una generación anual actual de 500.000 embriones transferidos y de ellos casi una cuarta parte en Sudamérica (Thibier, 2000,).

Por medio de tratamientos hormonales, que estimulan el desarrollo supernumerario de los folículos ováricos, destinados en condiciones fisiológicas a la atresia, se obtiene un número de embriones trasferibles que varía actualmente de 3 a 7. Su mayor aplicación es en la especie bovina, en la cual los costos y el rendimiento lo justifican. Los programas de transferencia de embriones (TE) despertaron grandes expectativas por que permitían, en forma similar a lo que ocurre con los toros, aumentar la capacidad reproductiva de una hembra bovina. Aplicados a los núcleos de producción, permiten acelerar efectivamente el progreso genético del rodeo lechero al contar con terneros, producto de esas hembras. Una de sus aplicaciones potenciales de importancia es la de aumentar la eficiencia reproductiva de animales exóticos y razas en peligro de extinción. Con un total de 520.712 embriones bovinos transferidos en el mundo en el año 1999, se estableció un nuevo récord (Thibier, 2000). También se reportaron 10.000 embriones ovinos y caprinos, 500 embriones equinos y unos pocos miles en la especie porcina citado por Palma, 2008.

La respuesta superovulatoria es una de las variables de mayor importancia en el éxito de un programa de TE. Teniendo en cuenta que se practica hace aproximadamente 35 años, fueron pocos los progresos cualitativos y cuantitativos que se lograron en los últimos 20 años. Posiblemente ello se deba a la complejidad de factores que afecta la respuesta hormonal (Hasler, 1992; Palma et al, 1995). Un hallazgo importante fue la determinación de la existencia del llamado folículo dominante. Su presencia, determinada por medio de

ultrasonografía, inhibe el desarrollo del resto de folículos (cohorte) y disminuye la respuesta superovulatoria

Grasso; et al, 1989; Guibault; *et al.*, 1991; Huhtinen; et al., 1992; Bo; *et al.*, 1996). Sin embargo, las precauciones recomendadas y los tratamientos para eliminar su efecto y provocar así un incremento del número de embriones transferibles (Adams; et al., 1994; Nasser; *et al.*, 1993), no aumentaron la producción de embriones in vivo (Hasler, 2000). Los resultados obtenidos en Europa entre 1991 y 2004 (AETE 1992- 2000) sobre 766.749 embriones recolectados, indican una mejora de la cantidad de embriones obtenidos pero con similar tasa de embriones transferibles. En el año 1991 se obtuvieron 4,6 embriones transferibles de 8,0 recolectados con una tasa de 57,5% de embriones transferibles, 13 años después se obtuvieron 5,6 de 9,2 (62,9%). Las tasas de embriones transferibles registrados en ese tiempo varían entre 53,8% a 64,4%. Resultados coincidentes se obtuvieron en la Compañía Emtran de Estados Unidos. El número de embriones transferibles por cada vaca superovulada (4,8) no se modificó entre 1979 y 1999 (Hasler, 2000).

Las altas tasas de ovocitos sin fecundar es otro de los factores negativos asociados a los tratamientos superovulatorios. Ello fue atribuido a alteraciones de la maduración como consecuencia del desorden bioquímico, metabólico y motriz existentes en el oviducto y el útero. Estos factores provocan una gran variabilidad de la respuesta superovulatoria que afecta negativamente el éxito y con ello el costo de la técnica. Comparando la eficiencia del empleo de los potenciales de reproducción de la hembra y el macho, a través de TE e IA respectivamente, los resultados son discordantes: un toro puede producir miles de terneros con su producción seminal, la única limitante es la producción de dosis inseminantes durante su vida útil. Una vaca, por el contrario, puede producir solo 50 a 100 terneros como máximo citado por Bó; et, al;(2010).

Los índices que muestran los estudios retrospectivos parecen indicar que esta biotecnología ha llegado a su nivel máximo de rendimiento, su eficiencia está

limitada por el número de embriones (6) producidos por cada hembra tratada. La tasa de preñez se mantiene en 50% de promedio, de manera que el potencial zootécnico de una hembra bovina se incrementa solamente en 2,5 veces (Thibier, 2000). Por otra parte, la relación costo beneficio la ubica después de la IA, como la tecnología que provee los progenitores de mayor valor genético y de los cuales se comercializan actualmente el semen y los embriones en el mundo. Ello contribuye significativamente al intercambio genético en el mundo. Su futuro no será muy diferente a su estado actual, mientras la variabilidad de los resultados y los altos precios de las hormonas no disminuyan (CLADEAD; 2008).

2.2. IMPORTANCIA DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES, APLICACIONES Y PERSPECTIVAS

Para Palma (2008) la Transferencia de Embriones (TE) permite difundir los genes de una hembra valiosa en mayor medida que la reproducción fisiológica, esto hace de la Técnica un instrumento de selección tanto para la creación de líneas genéticas como para la difusión del progreso genético. Por ejemplo de una vaca se obtienen un promedio de 5 terneros en su vida reproductiva. Si superovulamos y realizamos la transferencia de embriones se puede aumentar como mínimo 5 veces lo que es muy importante sobre todo en madres de toros.

En ganado de carne, permite producir gemelos y con ello aumentar el índice de procreo. La TE combinada con la Punción Folicular guiada por ultrasonografía y aplicando la FIV disminuye los costos de los embriones y aumenta significativamente su número (Palma; 2008).

Por otra parte la TE es una herramienta para salvaguardar genotipos en extinción, de especies silvestres, de especies de interés zootécnico, así como la introducción de nuevas razas (Palma; 2008).

2.2.1. Ventajas

- **Aumento de la presión de selección.-** Debido a que se produce un aumento en el número de descendientes por hembra, se reduce el número de madres seleccionadas de una generación para dar lugar a la generación siguiente de reproductores que renovarían el rebaño (Bó; et, al; 2010).
- **Reducción del Intervalo Inter generacional.-** Al aumentar en forma rápida las hembras jóvenes, se reduce el intervalo entre las generaciones, se difunden los reproductores de alto valor genético y por tanto se acelera el progreso genético citado por Bó; et, al;(2010).
- **La difusión de la mejora genética.-** Para Bó; et, al;(2010) aumentando la descendencia de hembras de alto valor genético la TE es un medio eficaz para la difusión del potencial genético por vía materna.
- **Protección de especies productivas y silvestres en extinción.-** El mantenimiento de los genotipos en extinción de interés zootécnico, así como de especies en extinción permite mantener y conservar la biodiversidad citado por Bó; et,al;(20010).
- **Seguridad sanitaria.-** Numerosos estudios han demostrado que mediante la TE logramos impedir la transmisión de enfermedades víricas o bacterianas siguiendo las normas del manual de la IETS (1998). La zona pelucida es una barrera natural (Stringfellow; et al.1991). Desde el punto de vista comercial esto es fundamental en el comercio de embriones congelados (Bó; et, al; 2010).
- **Ganancia genética.-** Para Bó; et, al; (2010) los índices de ganancia genética, en producción de leche, medidos en porcentaje/año, es posible evaluar el impacto de ésta tecnología .Con los test de progenie, a través de un sistema eficiente, la ganancia genética varía de 1.5 a 2,0% al año.

Con un esquema de Trasplante de Embriones (TE) con hembras seleccionadas, este índice varía entre 1,8 a 2,4%. Si se utilizan vaquillonas seleccionadas por el pedigree, el índice sube de 2,6 a 3,5%. Cuando se utiliza la bipartición de esos embriones el índice sube hasta un 4%. Con el clonado cuando se pueda aplicar a escala de la producción, el índice puede llegar hasta un 25% (Bó; et, al; 2010).

2.3. BASES FISIOLÓGICAS DEL CICLO OVÁRICO (VINCULADO A LA SUPEROVULACIÓN)

La regulación neurohormonal del ciclo ovárico en la vaca ocurre en diferentes niveles interrelacionados (Döcke, 1981). Las neuronas de la porción craneal del hipotálamo producen una neurohormona, la gonadoliberina o Gonadotropin-releasing-Hormon (GnRH), la cual vía axónica llega a la eminencia media donde es almacenada o liberada citado por Bó; et, al; (2010)

Cuando se libera va a la Adenohipófisis vía porta-hipofisiario (Döcke, 1984). La Adenohipófisis secreta FSH/LH en respuesta a la GnRH. La FSH es responsable del reclutamiento folicular que se produce durante cada onda folicular (Adams, 1994).

La liberación de la FSH y la LH en la sangre periférica es el producto de la interacción entre hipotálamo, hipófisis y ovarios a través de mecanismos de Feed-back +/- y el sistema vegetativo (Bó; et, al; 2010)

Al nacimiento las terneras cuentan con 1000 más ovocitos de los que maduran y ovularan. A través de la vida reproductiva del animal, los folículos con sus ovocitos son constantemente degenerados (R.P Elsen y Seidel 1985).

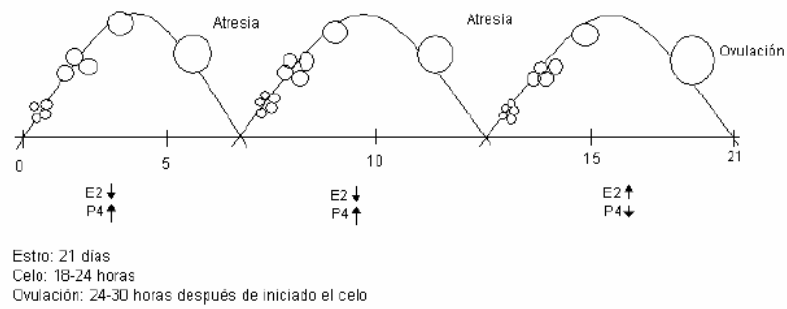
El total de los folículos que maduran en la vida de una vaca están predeterminados desde el nacimiento, son los folículos primarios. En la etapa de la pre-pubertad comienzan a crecer, las células planas pasan a cúbicas

(células de la granulosa), induciendo la formación de la zona pelúcida (ZP), se forma la teca externa y se forman los folículos secundarios que ya poseen receptores para la FSH, las células de la granulosa se multiplican y se comienza a formar el antro folicular (folículo de Graff) (Dócke, 1984).

2.4. ONDAS FOLICULARES

Muchos folículos se desarrollan durante el ciclo estral en la vaca. Las diversas ondas de crecimiento folicular se han podido estudiar, en los últimos años por medio de la Ultrasonografía (Crowe; et, al 1993).

Una onda folicular empieza con la emergencia de un grupo de pequeños folículos justo antes del día de ovulación en la cual hay un cuerpo lúteo lo que hace que la progesterona esté en niveles altos y los niveles de estrógeno son bajos los primeros días, uno de los folículos del grupo continúa creciendo y se hace dominante suprimiendo así el crecimiento de los demás folículos subordinados de esa onda, y la emergencia de una nueva onda folicular. Mientras el folículo dominante continúa creciendo, el crecimiento de los restantes folículos en el grupo cesa o se hace lento y finalmente sufren atresia. Una segunda onda emerge al rededor del día 7 a 10 después de la ovulación, en esta onda los niveles de progesterona son altos y estrógenos bajos porque el cuerpo lúteo está bien desarrollado, y en la última onda folicular los niveles de progesterona bajan y los niveles de estrógeno suben, esto se debe a que el cuerpo lúteo se cicatriza. El folículo ovulatorio surge de la onda final indicados en la figura 1 citado por Bó; et, al; (2010).



Fuente: Díaz, 2007.

Figura 1. Esquema de la dinámica folicular en la hembra bovina. Mecanismos de las ondas foliculares.

El crecimiento folicular ocurre en ondas de folículos antrales (4-5 mm) seguido por la selección de un folículo dominante y la regresión de los otros subordinados. Cuando no se produce la regresión del Cuerpo Lúteo (CL), el folículo dominante puede ir a la atresia y comienza una nueva onda folicular (Mapletoft y Pierson, 1995). Un seguimiento ultrasonográfico seriado ha demostrado que la mayoría de las vacas presentan dos o tres ondas foliculares durante el ciclo estral. La primera se inicia casi en seguida de la ovulación (en un corto período posterior), la segunda se inicia entre los 8 a 10 días. La tercera cuyo folículo dominante está destinado a ovular se inicia aproximadamente en el día 18 (Ginter; et al., 1989).

En varios laboratorios, utilizando la ultrasonografía, han llegado a la conclusión de que aproximadamente el 80% tienen tres y hasta 4 ondas, sin embargo en estudios de Ginter (1995), se demostró la predominancia de dos ondas de crecimiento folicular en la vaca.

Para Görlach, (1997), en el proceso de maduración de los folículos hasta la ovulación intervienen los estrógenos y se forman receptores para la LH en las células de la granulosa. La alta concentración de estrógenos en la sangre periférica bloquea la liberación de FSH por parte de la adenohipófisis. La

producción de estrógenos preovulatorios, induce un pico de LH que conlleva la ovulación del folículo maduro.

Después de la ovulación las células de la granulosa se luteinizan. Después del pico de LH el ovocito necesita estar entre 6-8 h. en el folículo para su total maduración. (Thibault, 1977).

La LH es la responsable de la formación y mantención de CL. Las células luteínicas poseen receptores para la Prostaglandina F2 alfa (PG) la cual se forma en el útero y es transportada hacia el ovario por contracorriente a través de la vena uterovárica/arteria ovárica, teniendo la propiedad de lisar el CL. Si se produce la luteólisis la secreción de progesterona por el CL cesa. (Hafez, 1988).

Una aplicación efectiva de la técnica de transferencia de embriones se realiza con el objetivo de inducir una ovulación múltiple, recuperar y transferir varios embriones, uno por receptora en ganado para leche y dos en ganado comercial de carne para obtener muchos terneros (Díaz, 2007).

Según Palma 2008, la selección de las donantes de embriones es un aspecto esencial en un programa de transferencia de embriones, ya que se realiza por lo menos 4 meses antes de iniciar los tratamientos de superovulación. Por este motivo se toman en cuenta una serie de criterios generales y particulares para realizar la selección de las mismas.

2.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

El obtener excelentes resultados en la transferencia de embriones, depende de un sin número de aspectos a considerar, entre ellos se encuentran el tipo de protocolo que se use, las hormonas (drogas) con los que se trabaje, el estado

nutricional de los animales, la raza, la edad, el clima y el manejo que se le esté dando a las vacas. La sumatoria de todos estos aspectos da como resultado el éxito o el fracaso en la transferencia de embriones (Palma; 2008).

Los temas discutidos anteriormente sobre la anatomía y fisiología del sistema reproductivo de la vaca serán de mucha importancia para entender cómo funcionan los protocolos de superovulación (SOV) de donadoras y los protocolos de sincronización de receptoras, para la transferencia de embriones (Julio Orellana y Manuel Peralta, 2007).

Aun teniendo los mejores conocimientos y experiencias sobre protocolos la respuesta de algunas vacas a ciertos protocolos de superovulación es incierta. Por eso, es necesario analizar muy de cerca todos los factores que afectan la respuesta de las vacas trabajadas a ciertos protocolos (Mapletoft; et, al 1993).

2.5.1. Factor Hormona (Droga)

Para Mapletoft; et, al (1993) las drogas deben ser aplicadas en las cantidades indicadas en el momento y la forma adecuada. Por eso, el técnico o la persona encargada debe estar bien capacitada, además de ser una persona muy responsable.

Las aplicaciones de la mayoría de estas drogas se hacen de forma intramuscular, se pueden poner arriba sobre la pierna o en la parte trasera sobre los muslos. Cuando se están haciendo las inyecciones de FSH se deben hacer en un intervalo de 12 horas, ya que la vida media de esta es de 5 horas; la mayoría de los centros genéticos utilizan el programa AM-PM. Si las vacas son inyectadas a las 6 de la mañana, se deben inyectar a las 6 de la tarde, durante los tratamientos de superovulación. Otro caso en la utilización de hormonas para la superovulación es el uso de eCG (Gonadotropina coriónica

equina) que causa problemas cuando se usa en exceso en la ovulación de los folículos y embriones de mala calidad (Becaluba, 2007).

Además se debe tomar en cuenta las legislaciones del país sobre la hormona que se está usando; ya que tienden a ser diferentes de un país a otro. Este debe ser el primer criterio a considerar cuando se va a desarrollar un proyecto de trabajar en un nuevo país (Carballo, 2012).

2.5.2. Factor Nutrición

Según Castro (2007) la condición corporal óptima para trabajar una vaca y obtener buenos resultados, en una vaca de carne es de 5 a 6 y en una lechera es de 2.5 a 3.0.

Las vacas que están muy gordas acumulan demasiada grasa subcutánea y alrededor de los ovarios, lo que disminuye la eficiencia de las drogas utilizadas. Bielanski y Yadav (1990) encontraron una reducción en el número de embriones transferibles en vacas con demasiada grasa. Por eso, las vacas que están gordas se les raciona una dieta en la cual se les disminuye la cantidad de concentrado, se baja el nivel de energía y mantiene el nivel de consumo de pasto.

La nutrición es uno de factores más importantes por lo cual se requiere dedicarle mucho tiempo, ya que las vacas necesitan ser evaluadas constantemente para que no incrementen de peso o que no lo pierdan. En el caso particular de la empresa GRI se manejan las vacas por lotes de iguales razas y de similar condición corporal. Entonces las vacas son evaluadas por lotes lo que facilita la suplementación de concentrado y heno (gramínea o leguminosa) (Palma 2008).

Según Palma y Brem (1993) el estado nutricional de la vaca donante tiene influencia tanto en la tasa de ovulación y fecundación como la viabilidad de los embriones. La nutrición de las vacas receptoras es menos crítica que las donantes, estas pueden ser alimentadas únicamente con forrajes y minerales, y los resultados en la transferencia de embriones, pueden ser exitosos siempre y cuando se les proporcione un buen manejo.

2.5.3. Factor Raza

Según Moreno (2004) las razas cebuínas (*Bos indicus*) necesitan menor cantidad o dosis de drogas como la FSH que las razas europeas (*Bos taurus*); Rodríguez (1988) indica que las razas europeas presentan mejor respuesta en la recuperación de embriones después del tratamiento de superovulación en comparación con las razas cebuínas. Por otro lado Gordon (2004) atribuye los beneficios a las razas lecheras por su docilidad, estas están en contacto con las personas, mientras el vacuno de carne está menos acostumbrado al manejo y puede mostrarse menos dócil, siendo este más sensible al estrés por el manejo.

Esto muestra el efecto que tienen las razas sobre la respuesta a las hormonas, tal es el caso de la FSH en el tratamiento de SOV, por lo cual se debe analizar bien antes de implementar los programas de transferencia de embriones (Bó, et, al 2010).

Según Castro (2007) otro aspecto muy importante sobre el factor raza es que las vacas *Bos indicus* al ser aspiradas para hacer fertilización in vitro dan mayores cantidades de oocitos que las razas europeas.

2.5.4. Factor Edad

De acuerdo a Palma y Brem, (1993) la edad tiene un efecto marcado sobre la respuesta que pueden mostrar las vacas receptoras a los programas de transferencia de embriones. Usando vaquillonas como receptoras se pueden obtener una mayor tasa de preñez, en comparación con las vacas adultas; por otra parte estas pueden presentar problemas de manejo durante la gestación, el parto y la lactancia.

Moreno (2004) documenta que las vacas donadoras responden con mayor facilidad a los tratamientos de SOV con FSH cuando están jóvenes, esto al relacionarlo con la raza, se puede decir que, entre más joven la donadora y más sangre de *Bos indicus* tenga recibirá menor cantidad de FSH. Moreno (2004) también documenta que la edad para practicar la primera SOV depende de la raza. Las vacas *Bos taurus* por ser razas que alcanzan la pubertad a una edad menor que las *Bos indicus* pueden responder con facilidad a los programas de SOV entre los 15 y 17 meses de edad, mientras tanto las vacas de origen cebuino se pueden iniciar a trabajar a los 20 meses de edad.

2.5.5. Factor Clima

Este factor influye sobre los demás factores; una vaca que no está en las condiciones climáticas óptimas, será difícil que produzca una cantidad rentable de embriones, así se use el mejor protocolo, esté bien de nutrición y se le facilite un excelente manejo. La vaca gastará mucha energía en adaptarse al ambiente y no tendrá energía para sus funciones reproductivas. Además, el metabolismo de las vacas se descontrola, lo que causa un estrés afectando negativamente la producción de embriones y oocitos. Putney et al. (1988) concluyeron que las vacas sometidas a temperaturas elevadas producen un mayor número de embriones degenerados y retardados e inclusive si se someten a bajas temperaturas.

También los cambios bruscos de temperatura no son buenos, ya que son un aspecto muy difícil de controlar cuando no se tienen las instalaciones adecuadas. En un estudio realizado en Alemania las temperaturas hasta 15°C produjeron un número mayor de embriones de buena calidad (Gordon, 1996).

2.5.6. Factor Protocolo

Al momento de establecer el protocolo se debe tomar en cuenta la rapidez con la que el cliente quiere que se realice el trabajo, si este quiere los embriones lo más rápido posible, se eligen las vacas que están ciclando, es decir las que presentan cuerpo lúteo se les establece el protocolo más corto (Palma, 2008).

2.5.7. Criterios Generales

- Es necesario estudiar todos los índices reproductivos y productivos de las hembras desde el primer parto.
- Los parámetros reproductivos y productivos deben estar en los rangos óptimos.
- Conocer los datos de la madre y del padre (datos de pedigree).
- Hacer un estudio del estado de salud general y reproductiva en particular (Bó, et, al 2010)

2.5.8. Criterios Particulares

- Una vez hecha la selección primaria de las posibles Donantes, es necesario realizarles un examen genital interno mediante ecografía.
- A las vacas que se seleccionan para Donantes después del examen ginecológico, se les debe estudiar el celo por lo menos dos veces antes de comenzar un tratamiento de sincronización y superovulación.
- Se debe observar que la duración de los ciclos estrales estén dentro de los rangos fisiológicos y que el celo sea bien manifiesto.

- Hay que tener en cuenta que se puede realizar transferencia de embriones, no solo para mejorar genéticamente una raza dentro de un establecimiento o región, sino también para introducir rápidamente razas que no hay en un País a efectos de cruces de interés o para preservar el fondo genético de razas en extinción. Nos referimos anteriormente a que la mayor limitante en la respuesta a los tratamientos de superovulación se debe a la variabilidad individual además de los otros factores que afectan la respuesta. Varios investigadores (Hasler, et al; 2000), reportaron que el rango de embriones transferibles por donante es de 5 a 7.

2.5.9. Diferentes Tratamientos de Superovulación de Donadoras

Se han utilizado para la superovulación diferentes tipos de gonadotropinas con diferentes presentaciones y dosis comerciales (Bó; *et al.*, 1995; 2002), las más utilizadas son tres:

- a) Gonadotropinas extraídas de la hipófisis del suino (p-FSH). Contiene una relación de FSH/LH, depende de la pureza del preparado que contenga la menor cantidad posible de LH, ya que la responsable de la superovulación (crecimiento de numerosos folículos hasta estado preovulatorio) es la FSH.
- b) Se ha estimado que la FSH tiene una vida media en sangre en la vaca como máximo de 5 h (Lerner; *et al.*, 1986), debido a esto la dosis total (máximo 50 Unidades ARMOUR), se debe fraccionar e inyectar i.m, dos veces al día (4-5 días), en dosis decrecientes. A las 72 h. de iniciado el tratamiento se inyecta 500 microgramos de (PG) en la mañana y 250 en la tarde. Se insemina a celo visto con dos servicios con 12 horas de intervalo. La colección de embriones se realiza en los días 7-8 al estado de blastocisto y blastocisto expandido implantándose en vaquillonas sincronizadas respecto al celo de la donante (-12/0/+12 h.). El tratamiento de superovulación se inicia preferentemente entre los días 9-10 del ciclo. Se puede partir contando desde un celo natural o sincronizando con PG o con métodos que combinan la progesterona o progestágenos con estrógenos y permiten iniciar la sincronización de las donantes en cualquier día del estro.

- c) Gonadotropina de yegua preñada (PMSG), o gonadotropina coriónica equina (eCG). En la vaca no tenía gran difusión debido a que tiene una vida media de 40 h y persiste durante 10 días en la sangre periférica, esto causa problemas porque persiste la estimulación ovárica, resultando una escasa colección de embriones transferibles y muchos folículos que no ovulan. En los últimos años se administra en combinación con un anticuerpo monoclonal (ANTI-PMSG), que resuelve éstos problemas (Crister; et al., 1980; Mapletoft; et al., 1990).
- d) Se administran 3000 UI i.m. (vaca para leche) o 1500-1700 (vaquillonas), preferentemente en los días 9-10 después del celo. A las 48 h se inyecta a las donantes con PG, 500 microgramos en la mañana y 250 en la tarde. El celo se presenta a las 48 h., y las vacas se inseminan 12 y 24 h después de detectado y se da una inyección i.v. de un equivalente en unidades internacionales de anti-PMSG con la primera inseminación. Entre los días 7-8 se realiza la colecta de embriones y se transfieren a receptoras sincronizadas, o se congelan.
- e) Los rangos son similares a los obtenidos con tratamientos con FSH, con la ventaja de que es un tratamiento más práctico en condiciones de campo (Larocca; et al., 1996; Larocca; et al, 1998).
- f) La gonadotropina de la menopausia humana (hMG). Su uso a nivel de la producción no está difundido por lo elevado de su costo.

2.6. VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA

El análisis se efectúa según lo propuesto por Mapletoft y Murphy (1987) quienes consideraron por un lado, la variabilidad a los tratamientos hormonales y por otro, la variabilidad inherente a las donantes y a su medio ambiente.

2.6.1. Variabilidad Debida a los Tratamientos Hormonales

2.6.1.1. Gonado tropinas empleadas.

La introducción de la superovulación se efectuó con gonadotrofina corionica equina (eCG) o principalmente con extractos de pituitaria porcina que generalmente se conoce como FSH-P, pensé que en muchos casos contienen mayor cantidad de hormona luteinizante –LH- que de hormonas folículo estimulantes –FSH- (Esdén y col., 1978).

La eCG anteriormente denominada gonadotrofina sérica de Yegua preñada – PMSG- es una glicoproteína producida por los cálices endometriales y se comprueban biológicamente entre los días 35 y 140 de gestación. La relación FSH/LH de esta hormona varía durante la preñez (Godke y col., 1978; Papkoff, 1981). Debido a su elevado peso molecular no atraviesa el filtro renal y por lo tanto, tiene larga vida media en la sangre. Esto permite inducir superovulación en las hembras bovinas mediante la administración de una dosis única entre los días 8 y 14 del ciclo estral (Saumande y Chupin, 1981). Sin embargo su permanencia es prolongada en sangre provoca un crecimiento folicular disperso, con niveles altos de estrógenos que afectan tanto la tasa de fecundación como la calidad embrionaria. Además genera procesos inmunitarios que hacen necesario, en tratamientos posteriores, emplear una mayor dosis de hormona para lograr el mismo efecto (Ramakrishna y Ramachandraiah, 1989).

La FSH-p es la gonadotropina más empleada en la superovulación de hembras bovinas. El tratamiento de superovulación con esta hormona se basa en la administración de dosis diarias durante 4 o 5 días (Looney y col., 1981), comenzando en forma general en los días 9 y 13 del ciclo estral (Donaldson, 1984).

La HMG es un preparado altamente purificado de vida media muy corta. Requiere un esquema de administración idéntico al de la FSH-p (Storring y col., 1976; Lauria y col., 1982). Los resultados de superovulación con esta hormona son comparables con los de la eCG (Newcomb, 1980; Abdul Saeed y col., 1989;) y con los de la FSH-p (Critser y col., 1982; Lauria, y col., 1982; Mapletoft y col., 1988; Tegegne y col., 1994). Alcivar y col (1984) observaron con la HMG un porcentaje de preñes menor luego de la transferencia no quirúrgica de los embriones con respecto al obtenido con la FSH-p.

2.6.1.2. Dosis.

En los tratamientos de superovulación, la existencia de una relación de dosis-respuesta ha sido demostrada por distintas gonadotropinas y en razas diferentes (Mc Gowan y col., 1983; Donaldson, 1984; Donaldson y Ward 1985; Pawlyshyn y col., 1986; Saumande y Chupin, 1986; Wang y col., 1988; Wu y col., 1988; Zeitoun y col., 1988). Esto significa que cuando la dosis se incrementa más allá de lo óptimo, el número de ovulaciones no aumenta y de ovocitos fecundados y embriones transferibles disminuye.

Los efectos negativos de altas dosis de gonadotropinas se relacionan con los fenómenos de sobreestimulación ovárica que serán considerados cuando se trate la influencia de edad de la donante. En los animales sobreestimulados, generalmente se obtienen también una menor tasa de recolección (ovocitos y embriones recolectados en función de los cuerpos lúteos palpados u observados). Según esto se definen algunas razones:

- Retención de ovocitos en los folículos luteinizados y en los cuerpos lúteos (Monniaux y col., 1983).
- Retención de ovocitos y/o embriones en los oviductos (Mc Gowan y col., 1985).
- Niveles muy altos de estrógenos producidos por los grandes folículos no ovulados que bloquearían la capacidad de captación de las fimbrias con la

consiguiente caída de ovocitos en la cavidad abdominal (Booth; et, al; 1975).

A pesar de que en la práctica, cuando una donante no responde a las dosis iniciales de FSH-p es común incrementarla para un segundo tratamiento: el análisis de la información disponible revela que este aumento de la dosis de gonadotrofina no es útil en el tratamiento de donantes que desde su incorporación a un programa de superovulación responden de forma irregular al tratamiento (donante problema). Además al incrementar la dosis de gonadotrofina aumenta el porcentaje de recolecciones en las que no se obtienen embriones transferibles (Donaldson, 1984).

2.7. NUEVOS TRATAMIENTOS HORMONALES PARA LA SUPEROVULACIÓN DE DONANTES DE EMBRIONES BOVINOS

La variabilidad en la respuesta a los tratamientos superovulatorios y el tiempo y esfuerzo necesarios para la administración de los tratamientos, han sido los principales factores que afectan la aplicación de la transferencia de embriones en programas de mejoramiento genético (Bó; *et al.*, 2008). Si bien los avances en el conocimiento de los últimos años no ha podido aumentar significativamente el número de embriones transferibles que se producen en promedio por tratamiento superovulatorio, el desarrollo de protocolos que controlan la emergencia de la onda folicular (Bó; *et al.*, 1995; 2002a) y la ovulación (Baruselli; *et al.*, 2006; Bó; *et al.*, 2006) han permitido la superovulación de grupos de donantes independientemente del momento del ciclo estral en que se encontraban y la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) de ellas, sin la necesidad de detectar celos. Estos tratamientos han tenido un impacto positivo en la aplicación comercial de programas de transferencias embrionarias, porque han facilitado la programación de los protocolos de trabajo, sin ser tan dependientes del conocimiento y la habilidad del personal en la detección de celos. Sin embargo, todavía existen problemas que se presentan y que potencialmente pueden dar lugar a errores que resulten

en una disminución de la respuesta superovulatoria, o peor aún, en una ausencia total de respuesta. En ese sentido, la necesidad de aplicaciones de FSH cada 12 h es un factor de preocupación que debería ser solucionado y simplificado (Bó; *et al.*, 1994a). Además, el método más comúnmente utilizado para la sincronización de la emergencia de la onda folicular para la superovulación consiste en la aplicación de dispositivos con progesterona y estradiol (Mapletoft; *et al.*, 2000). Estos tratamientos no pueden ser usados en muchos países del mundo por preocupaciones de los efectos que pudieran producir los estrógenos en la cadena alimenticia (Lane; *et al.*, 2008).

2.8. MANIPULACIÓN DE LA ONDA FOLICULAR PARA LA SUPEROVULACIÓN

Tradicionalmente los protocolos de superovulación eran comenzados en la fase luteal media, aproximadamente entre el día 9 a 11 después del celo (Lindsell; *et al.*, 1986; Mapletoft y Pierson, 1993). Esto se debe a que en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza en promedio entre el día 9 y 10 del ciclo (Bó y Caccia, 2002b; Ginther; *et al.*, 1989). Sin embargo trabajos posteriores han demostrado que la respuesta superovulatoria es mayor cuando los tratamientos con gonadotropinas son iniciados en el momento exacto de la emergencia de la onda folicular, en vez de 1 o 2 días más tarde (Nasser; *et al.*, 1993; Adams; *et al.*, 1994). Por lo tanto, el tratamiento convencional tiene dos inconvenientes: 1) requiere tener personal entrenado y dedicado a la detección de los celos y una respuesta 100% efectiva a la pre-sincronización de todas las donantes para tener el llamado “celo Base” y 2) desde el punto de vista práctico, es imposible tener a todas las donantes a ser súper estimuladas al inicio de una onda folicular el día que elegimos comenzar con la aplicación de la gonadotropina.

En la década del 90 se desarrollaron tratamientos con progestágenos y esteres de estradiol, que inducen la atresia de todos los folículos y el comienzo de una nueva onda folicular 4 días después (Bó; *et al.*, 1994b; 1995; 1996). Este

tratamiento es utilizado por muchos profesionales alrededor del mundo (Beal, 1999; Mapletoft; *et al.*, 2000; Bó; *et al.*, 2006; Baruselli; *et al.*, 2006), pero su uso ha sido restringido recientemente en países como USA, Nueva Zelandia y los de la Unión Europea, lo cual deja a muchos profesionales que realizan transferencia de embriones en un serio dilema.

Esto creó la necesidad de desarrollar tratamientos que sincronicen el comienzo de una nueva onda folicular que no utilicen esteroides de estradiol. Un método alternativo ya descrito hace tiempo consiste en eliminar, por punción guiada por ultrasonografía, todos los folículos ≥ 5 mm y de esta manera, inducir una nueva onda folicular, aproximadamente 1,5 días después (Bergfelt; *et al.*, 1994).

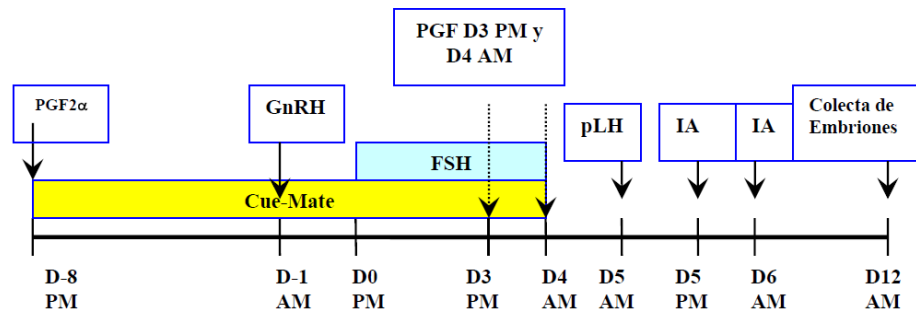
De esta manera se puede comenzar la superovulación uno o dos días después de la ablación del folículo dominante (Beal, 1999; Bungarts y Niemann, 1994; Kim; *et al.*, 2001) ó de todos los folículos presentes en el ovario (Bergfelt; *et al.*, 1997; Hill y Kuehner, 1996). El inconveniente que tiene este método es que hay que contar con un equipo de ultrasonografía y personal capacitado para realizar dicho trabajo, lo que hace que esta tecnología se adapte más a centros de producción de embriones, donde todas las donantes se encuentran concentradas en un solo lugar, que a la superovulación a campo, en establecimientos de distintos productores.

Otra alternativa es la utilización de GnRH o pLH para inducir la ovulación del folículo dominante (Macmillan y Thatcher, 1991) y así tener el inicio de una nueva onda folicular 1,5 a 2 días después (Pursley; *et al.*, 1995); pero el comienzo de la onda es sincronizado solamente cuando el tratamiento resulta en ovulación del folículo dominante (Martinez; *et al.*, 1999). En vacas lecheras, los primeros trabajos con esta temática reportaron tasas de ovulación del folículo dominante del 85% después de la administración de GnRH (Pursley; *et al.*, 1995), pero otros más recientes (Colazo; *et al.* 2007b) reportaron un promedio de ovulación de 62,4% después de la administración de LH porcina y un 44,3% cuando se trataron con GnRH ($P < 0.01$). Otro estudio mostró un

promedio de ovulación de 78% y 56% en vaquillonas tratadas con LH porcina o GnRH, respectivamente (Martinez, *et al.*, 1999). La incidencia de ovulación en respuesta a la GnRH o LH en vacas de carne parecen ser similares a las vaquillonas aproximadamente 60%, (Colazo; *et al.*, 2007a). Por esta razón, los tratamientos con GnRH antes de la súper estimulación han resultado en menores respuestas superovulatorias que los tratamientos iniciados luego de la aspiración folicular (Deyo; *et al.*, 2001). No obstante, en un análisis retrospectivo de superovulaciones comerciales, no encontraron diferencias en el número de embriones transferibles entre donantes con CIDR y súper estimuladas 4 días después del tratamiento con estradiol 17 β y 100 mg de progesterona (7,8 embriones transferibles, n=1136) y aquellas súper estimuladas 48 h después de una inyección de GnRH (7,7 embriones transferibles, n=56). En otro estudio más reciente (Wock; *et al.*, 2008), vacas lecheras (n=411) fueron superovuladas seguido del uso de GnRH o estradiol para sincronizar la emergencia de la onda folicular.

Los animales tratados con GnRH recibieron un CIDR en días aleatorios del ciclo estral (día 0), la GnRH fue inyectada el día 3 y la súper estimulación fue iniciada 48 h más tarde. Las otras donantes fueron súper estimuladas 4 días después de la inserción de un CIDR y la administración 4 mg de estradiol-17 β . El análisis de los datos no mostró diferencias significativas ($P>0,05$) entre los grupos tratados con estradiol ó GnRH en el número de ovocitos/embriones recuperados ($9,8\pm 0,6$ vs. $9,7\pm 0,7$), ni en los grado 1 y 2 ($4,7\pm 0,4$ vs. $4,5\pm 0,4$). Finalmente, en otro análisis retrospectivo de superovulaciones comerciales en vacas lecheras, hubo un grupo de donantes (n=245) que recibieron GnRH 1,5 días después de la inserción de un CIDR y 60 h antes del inicio del tratamiento con FSH que tuvieron una respuesta ($5,6\pm 6,0$ embriones transferibles) que no difirió de las de donantes tratadas con estradiol-17 β (n=691; $6,1\pm 6,2$ embriones transferibles). Sin embargo, las donantes con estradiol-17 β si tuvieron una respuesta mayor ($P<0,05$) que las de vacas iniciadas entre los días 7 a 14 del ciclo estral (n=614; $5,3\pm 5,5$ embriones transferibles). Por lo tanto, estudios experimentales apropiadamente desarrollados y controlados deben ser realizados para confirmar estos resultados (Bó, *et al.* 2009).

La súper estimulación de la primera onda folicular puede ser empleada en grupos de donantes, independientemente del momento del ciclo estral en que se encuentren y sin afectar la respuesta superovulatoria, sin la necesidad del uso de estradiol para sincronizar la emergencia de la onda folicular. El tratamiento recomendado esta esquematizado en la figura 2 (Bó, et, al 2009).



Fuente: Bó; et, al., 2009

Figura 2. Protocolo de Sincronización sin estrógenos

Tratamiento de sincronización de la ovulación para realizar la superestimulación durante la primera onda folicular en bovinos: Las donantes reciben un dispositivo liberador de progesterona (Cue - Mate) junto con una dosis de PGF2α (día -8) y una dosis de GnRH 7 días después (día -1). En el día 0 (36 h después de la GnRH) se comienza con el tratamiento con FSH en 8 dosis decrecientes administradas cada 12 h y por 4 días. Se administra PGF2α con las dos últimas inyecciones de FSH y se retira el Cue-Mate con la última FSH. Luego se induce la ovulación con pLH a las 24 h de la remoción del Cue-Mate y las donantes son inseminadas 12 y 24 h después. Los embriones son colectados a los 7 días de la IA itado por Bó, et, al (2009).

Aunque la administración de GnRH para sincronizar la emergencia de la onda folicular parece ser demasiado variable para súper estimulación, la pre-sincronización mejora las respuestas y se puede de esta manera súper estimular a las donantes en el momento de emergencia de la primera onda folicular (en el día de la ovulación), con resultados similares a los que se obtienen utilizando estradiol (Bó; et al., 2009).

2.9. ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTOS SUPERESTIMULATORIOS SIN EL USO DE ESTRÓGENOS

Desde octubre del 2006 el uso de estrógenos ha sido restringido en países de la Unión Europea, debido a cuestiones políticas y de presión pública ya que hay preocupaciones de los efectos que pudieran producir los estrógenos en la cadena alimenticia del ser humano (Lane et al., 2008). Estas conclusiones derivan de resultados de estudios realizados en la década del 50 con muy altas dosis de estradiol en ratones, que indicaron que los estrógenos podrían ser cancerígenos. Actualmente otros países como USA y Nueva Zelandia ya se han unido a la restricción del uso de estrógeno, lo cual deja a muchos profesionales que realizan transferencia de embriones en un serio dilema.

Así como se prohibió en dichas regiones se puede llegar a prohibir en todo el mundo en algún momento. Esto lleva a una problemática ya que reduciría considerablemente la posibilidad de superovular vacas en la escala en que se estaba realizando, lo que significaría una disminución de la posibilidad de mejoramiento genético rápido por este medio. Por lo tanto, tenemos la necesidad de buscar protocolos alternativos de superovulación que sean prácticos, efectivos y no requieran el uso de estrógenos.

Una alternativa al uso de estradiol consiste en eliminar, por punción guiada por ultrasonografía, todos los folículos mayores a 4 mm. Con esto la nueva onda folicular se inicia aproximadamente 36 h después (Bergfelt et al., 1994). De esta manera se puede comenzar la superovulación uno o dos días después de la ablación del folículo dominante (Bungarts y Niemann, 1994; Beal, 1999; Kim et al., 2001) o de todos los folículos (Hill y Kuehner, 1996; Bergfelt et al., 1997). El inconveniente que tiene este método es que hay que contar con un equipo costoso y personal capacitado para realizar dicho trabajo.

Otra alternativa es la utilización de GnRH o LH para la ovulación del folículo dominante (Macmillan y Thatcher, 1991) y así tener el inicio de la nueva onda folicular aproximadamente 2 días después (Pursley et al., 1995). Pero el

comienzo de onda es sincronizado solamente cuando el tratamiento resulta en ovulación (Martinez et al., 1999). Colazo et al. (2007b) reportaron en un trabajo realizado con vacas de leche en lactancia un promedio de ovulación de 62,4% cuando se trataron con 25 mg de LH porcina (pLH; Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Canada) y un 44,3% cuando se trataron con GnRH ($P < 0,01$). Otro estudio mostró un promedio de ovulación de 78% y 56% en vaquillonas tratadas con pLH o GnRH respectivamente (Martinez et al., 1999). La incidencia de ovulación en respuesta a la GnRH o pLH en vacas de carne con cría al pie parecen ser más similares a las vaquillonas que a las vacas de leche en lactancia, aproximadamente 60% (Colazo et al., 2007a). Por esta razón, los tratamientos con GnRH antes de la superestimulación han resultado en menores respuestas superovulatorias que los tratamientos iniciados luego de la aspiración folicular citado por Deyo et al., (2001).

Otra alternativa puede ser la regulación negativa de la glándula pituitaria. Se ha demostrado en el bovino que luego de la administración experimental con un agonista de la GnRH, los folículos crecieron hasta 8 mm de diámetro cuando se inhibió la liberación de LH y hasta 4 mm de diámetro cuando se inhibieron tanto la liberación FSH como los pulsos de LH (Gong et al., 1996). D'Occhio et al., 1997, encontraron respuestas superovulatorias similares en vacas tratadas con implantes del super-agonista de GnRH deslorelina 7 días antes del inicio de la superestimulación y vacas tratadas con benzoato de estradiol y dispositivos con P4 4 días antes del inicio de la superestimulación. Lamentablemente estos implantes no están disponibles en el mercado.

Otra manera de inhibir la liberación de GnRH puede ser la utilización de una vacuna anti-GnRH (Crowe et al., 1993; Prendiville et al., 1995). Los resultados de su aplicación mostraron que los folículos crecieron hasta 3 mm y que el crecimiento pudo ser reanudado con tratamientos con FSH (Crowe et al., 1993). La tasa de crecimiento que tuvieron en respuesta a la FSH exógena fue similar a los controles (Crowe et al., 1993). Nuevamente estas vacunas no están por ahora disponibles en el mercado y además una vez que los animales son vacunados existen dudas sobre la posibilidad de preñar a esos animales después del tratamiento.

Un método que también ha sido investigado es iniciar el tratamiento con FSH en el momento de emergencia de la primera onda folicular. La primera onda emerge en el día de la ovulación, o el día posterior del comienzo del estro y no hay diferencias entre los animales de dos o tres ondas foliculares por ciclo estral (Ginther et al., 1989). Nasser et al. (1993) demostraron que la superestimulación puede ser iniciada con éxito en el momento de emergencia de la primera onda folicular y Adams (1994) demostraron que la respuesta superovulatoria no difirió cuando los tratamientos con gonadotropinas fueron iniciados en el momento de la emergencia de la primera o segunda onda folicular. Sin embargo, debe insertarse un dispositivo con P4 en el momento de iniciar los tratamientos para facilitar la regresión luteal (Bó et al., 2007) y para mejorar la calidad del ovocito/embrión (Nasser et al 2011; Rivera et al, 2011). El punto es determinar el momento de la ovulación con ultrasonografía o iniciar los tratamientos un día después de comienzo el estro. Para evitar la necesidad de detectar estro u ovulación, Nasser et al. (2011) indujo una ovulación sincrónica en vacas Nelore (*Bos indicus*) con un protocolo iniciado en el día 0 con la administración de estradiol y CIDR (Pfizer Salud Animal), en el día 5 colocó PGF; retiró el CIDR el día 8 seguida por la administración de pLH 24 h después. Los tratamientos superovulatorios fueron iniciados 24 h después de la pLH. No hubo diferencia en el número de embriones transferibles entre este grupo ($8.0 \pm 1,8$) y el control que fue tratado en estradiol y P4 cuatro días antes de la FSH (6.6 ± 2.0), pero ambos tuvieron un mayor número de embriones que si los tratamientos se iniciaban en el momento de emergencia de la primera onda pero sin la reinsertión de un nuevo CIDR durante las aplicaciones de FSH (0.2 ± 0.2 ; $P < 0.05$).

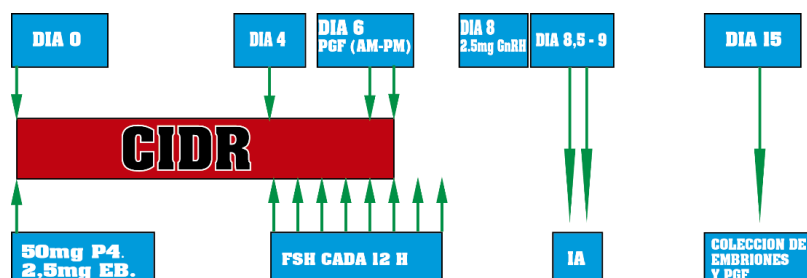
Para iniciar la superestimulación en el comienzo de una onda folicular se podría también inducir el crecimiento de un folículo persistente utilizando dispositivos con P4 (Savio et al., 1993; Stock y Fortune, 1993) y la administración de una inyección de P4 al final del tratamiento (Anderson y Day, 1994). Este tratamiento resulto en la regresión de un folículo persistente y el desarrollo subsiguiente de una nueva onda folicular en aproximadamente 3 a 5 días. Sin embargo, en un trabajo en el cual se administró un CIDR usado y una inyección

de 150 mg de P4 en el día 13 del ciclo, no hubo alteración en el patrón de la onda folicular (Colazo et al., 2007a). En otro estudio la administración de 300 mg diarios de P4 durante la fase estática de crecimiento del folículo dominante suprimió el crecimiento y acortó la vida media del folículo dominante (Adams et al., 1994). Pero la emergencia de la próxima onda fue variable en este último caso.

Finalmente otra posibilidad es la inducción de la ovulación del folículo persistente mediante la aplicación de GnRH o pLH. En trabajos realizados en Canadá por Small et al., (2009), la administración de GnRH en vacas que habían sido previamente tratadas con un CIDR reutilizado por 7 a 10 días y PGF en el momento de la inserción del CIDR, resultaron en la ovulación del folículo dominante dentro de las 30 h de la administración de GnRH y el comienzo de una onda folicular.

2.10. TRATAMIENTO PARA DONADORAS BOVINAS APLICADO A NIVEL LOCAL.

Científicos de la Universidad de Saskatchewan, desarrollaron un protocolo para sincronizar la onda folicular que permitiera iniciar los tratamientos superestimuladores en el momento más conveniente (Figura 3). Además, este protocolo, evita la necesidad de detectar celo y esperar hasta la mitad del ciclo estral para iniciar los tratamientos.




Fuente: Publicación de Ciencias Veterinarias volumen 9 Universidad Nacional de la Pampa, General Pico 2007

Figura 3. Protocolo de supe estimulación con Estrógenos.

En el día 0 (cualquier día del ciclo estral), las donantes son tratadas con un implante liberador de progestinas (CIDRB), 2, 5 mg de estradiol-17b (E-17b), y 50 mg de progesterona (P4). En el día 4 se inicia el tratamiento superestimulador. En el día 6 se inyecta prostaglandina (PGF; 2 tratamientos AM y PM), El día 7 se retira el dispositivo con progestina (AM) y el día 8(AM) se aplica 2,5mg de GnRH. Las donantes se inseminan en los días 8 (PM) y 9 (AM; sin detectar celo). La colección de embriones es realizada en el día 15 y los animales reciben PGF después del lavaje.

Los resultados obtenidos de programas de superestimulación tanto experimentales como comerciales (Bo et al., 2002) han demostrado que la respuesta superovulatorias de donantes tratadas con este protocolo es comparable con la respuesta de donantes tratadas con el protocolo tradicional tratada en día 8 a 12 después del celo natural.

Cuadro 1. Descripción detallada del protocolo con estrógenos para superovulación.

Protocolo para Embryo Transfer					
AMAZONBYOTECH.					
DIA	FECHA	HORA	TRATAMIENTO	Folltropin	
0	24-feb	6:00	Disp. P4 + 50 mg P4 + 2.5 mg EB		
4	28-feb	6:00		3,5 ml	
		18:00		3,5 ml	
5	01-mar	6:00		2,5 ml	
		18:00		2,5 ml	
6	02-mar	6:00	2ml PGF	2 ml	
		18:00	2ml PGF	2 ml	
7	03-mar	6:00	Retirar dispositivo	0,5 ml	
		18:00		0,5 ml	
8	04-mar	6:00	2 ml de GnRH		
		18:00	I.A.		
9	05-mar	6:00	I. A.		
15	11-mar		COLECTA DE EMBRIONES		

Fuente: IRAC, 2009.

Fuente: VII Simposio internacional de reproducción animal

Dispositivo CIDR = Disp.P4

Progesterona inyectable = P4

Valerato de estradiol = EB.

Prostaglandina = PGF.

Hormona liberadora de gonadotrofinas = GnRH.

Inseminación Artificial = I.A.

2.11. COLECCIÓN DE EMBRIONES

Según Bó, et, al., (2010), actualmente, la recolección transcervical, no quirúrgica es la técnica utilizada. La recolección de embriones a través de una laparotomía medio ventral se recomienda para casos especiales, como el caso de un bloqueo del oviducto, el que podría ser corregido quirúrgicamente. La incisión a través del flanco debe ser realizada bajo anestesia local y puede ser exitosa bajo ciertas condiciones, sin embargo, no es recomendable por el hecho de la dificultad para exponer el tracto reproductivo. Esta técnica conduce a mayor agotamiento del animal, menor porcentaje de recuperación de embriones y una alta incidencia de adherencias.

2.11.1. No Quirúrgica

Según la metodología a continuación descrita por CLADEAD., (2008) para fines comerciales, se recobran los embriones entre los días 6-8 después del estro e inseminación artificial. Antes de éste tiempo, muchos embriones estarán en el oviducto y no podrán ser recolectados por medio no quirúrgicos. Las vacas donantes deben ser manejadas de forma de evitarles cualquier factor de estrés.

- Se las coloca en un cepo en el que se realizará la operación. La base de la cola es rasurada, lavada con jabón antiséptico y enjuagada con alcohol al 70%; luego, se administra una inyección epidural de 5ml de lidocaína al 2%. Se comprueba la buena administración de la inyección, observando la

flacidez de la cola. El área alrededor de la vulva es lavada, esterilizada, igual manera las manos y guantes del técnico, mediante palpación rectal se detecta el número de cuerpos lúteos que tiene cada ovario.

- El paso siguiente es apartar los labios vulvares y, si es necesario, introducir un dilatador, a través de la vagina y colocar en el lumen del cérvix.
- Ejerciendo poca presión, el dilatador se pasa a través del cérvix, con sumo cuidado, para facilitar más tarde, el paso de la sonda.
- Una sonda con balón inflable de calibre francés 18 ó 24 (dependiendo del tamaño del útero), con una varilla de acero inoxidable en su interior, se introduce por la vagina y se pasa a través del lumen del cérvix dilatado. La sonda, luego, es manipulada en el cuerno uterino seleccionando el lugar adecuado y así el balón inflable es situado lo más craneal posible.
- El balón es inflado con unos 10 ó 15 ml de aire, dependiendo de la sonda utilizada. El balón deberá estar ajustado a la pared del cuerno uterino, para evitar cualquier escape del medio que se va a inyectar. Sin embargo, si el balón está muy ajustado, el endometrio, fácilmente, es dañado y dificultará la búsqueda de los embriones. Generalmente, 10 a 15 ml de aire son necesarios para vaquillonas y 18 a 22 ml para vacas.
- Para el lavado uterino se utiliza un litro de medio PBS (fosfato buffersalino) o solución Ringer lactato. Se calienta a 37 C° y se acondiciona en un transfusor de suero y se le adapta a un tubo de drenaje. Este tubo se conecta con el tubo de entrada de la sonda y un adaptador en forma de Y.
- Una parte del tubo de goma de 0.5 m de largo se conecta al tubo de salida del balón catéter a través del adaptador en Y, y se conecta a un dispositivo con filtro EmCom donde se realiza la colección de embriones. La entrada y salida del medio utilizado para la colecta se regula mediante el uso de pinzas de Mohr, o similares (hemostáticas, etc).
- Mediante la palpación rectal se hace un masaje en la unión útero tubarica con los dedos índice y pulgar y se controla el ingreso y salida de medio, lo que se repite de 6 a 10 veces utilizando entre 500 a 800 ml por cada cuerno uterino.
- Después que se lava un cuerno uterino, se retira el balón catéter, se limpia y se cambia al cuerno opuesto repitiendo el mismo procedimiento realizado en el primer cuerno.

2.11.2. Manipulación

Según Bó, et, al., (2010), para localizar, identificar, aislar, manipular y clasificar ovocitos infértiles y embriones se requiere considerable experiencia. Los embriones fácilmente pueden pasar desapercibidos así que cada caja Petri debe ser examinada por una misma persona dos veces y chequeada por otro técnico para rectificar o ratificar el número de embriones encontrados.

Las cajas Petri de fondo plano y cuadrículado son muy eficientes en la búsqueda de embriones utilizando lupas estereoscópicas (Bó, et, al., 2010).

Para Bó, et, al.,(2010) la mayoría de los embriones colectados deberán estar en un mismo estado de desarrollo, en el día 5 y 6 se encuentran en un estado de mórula y aquellos recolectados el día 7 o más tarde los encontraremos en estado de blastocisto. Debido al hecho de que los folículos de un ovario sometido a un tratamiento hormonal ovulan en un determinado tiempo, un considerable rango de desarrollo se encuentra normalmente.

La morfología embrionaria esta correlacionada con las tasas de preñez, por lo tanto embriones que están retardados en su desarrollo por dos o más días no deberían ser transferidos (Bó, et, al., 2010).

Bó, et, al., (2010) a determinado que los embriones se evalúan y así las receptoras apropiadas deberán ser seleccionadas. En general los mejores embriones deben ser transferidos a buenas receptoras, en adición la edad del embrión puede hacerse coincidir hasta cierto punto con el ambiente uterino de la receptora. El embrión debe ser esférico, compacto, con blastómeros del mismo tamaño con color, textura y citoplasma uniforme; el espacio perivitelino debe estar vacío y de diámetro regular y la zona pelúcida simétrica y sin arrugas o pliegues, no debe existir ningún tipo de detrito celular.

Algunas características que pueden ser evaluadas incluyen: compactación de las células, regularidad de la forma del embrión, variación en el tamaño de las

células, color y textura de citoplasma, presencia de grandes vesículas, presencia de células extruidas, diámetro y regularidad de la zona pelúcida, presencia de detritus celulares (Bó, et, al.,2010).

2.11.3. Necesidades y Acondicionamiento del Laboratorio en Condiciones de un Centro y en Condiciones de Campo.

2.11.3.1. Condiciones óptimas

Para CLADEAD., (2008) lo más importante es que el área del laboratorio se encuentre totalmente protegida del ambiente externo impidiéndose la contaminación del laboratorio. En caso de tener ventanas el laboratorio estas deben estar protegidas con tejido contra insectos.

Las mesadas deben tener azulejos u otro material fácil de limpiar y esterilizar. A su vez las paredes que hacen ángulo con las mesadas deben ser del mismo material hasta 70 cm de altura (CLADEAD., 2008).

Es conveniente contar con luz ultravioleta en el techo del laboratorio (CLADEAD., 2008)

2.11.3.2. Equipos necesarios

- Cámara de flujo laminar para preparación de medios
- Esterilizador y desionizador de H₂O
- Incubadora graduable
- Filtro con bomba de vacío
- Esterilizador de aire seco
- Autoclave
- Esterilizador con Óxido de Etileno
- Lupas hasta 80 aumentos

- Microscopio invertido hasta 400 aumentos, si es posible con cámara de video adaptada a un monitor
- Platina caliente
- Biostato con N2 liquido
- Congeladora programable de embriones
- Baño de H2O térmico
- Sistema de regulación de Temperatura ambiente del laboratorio

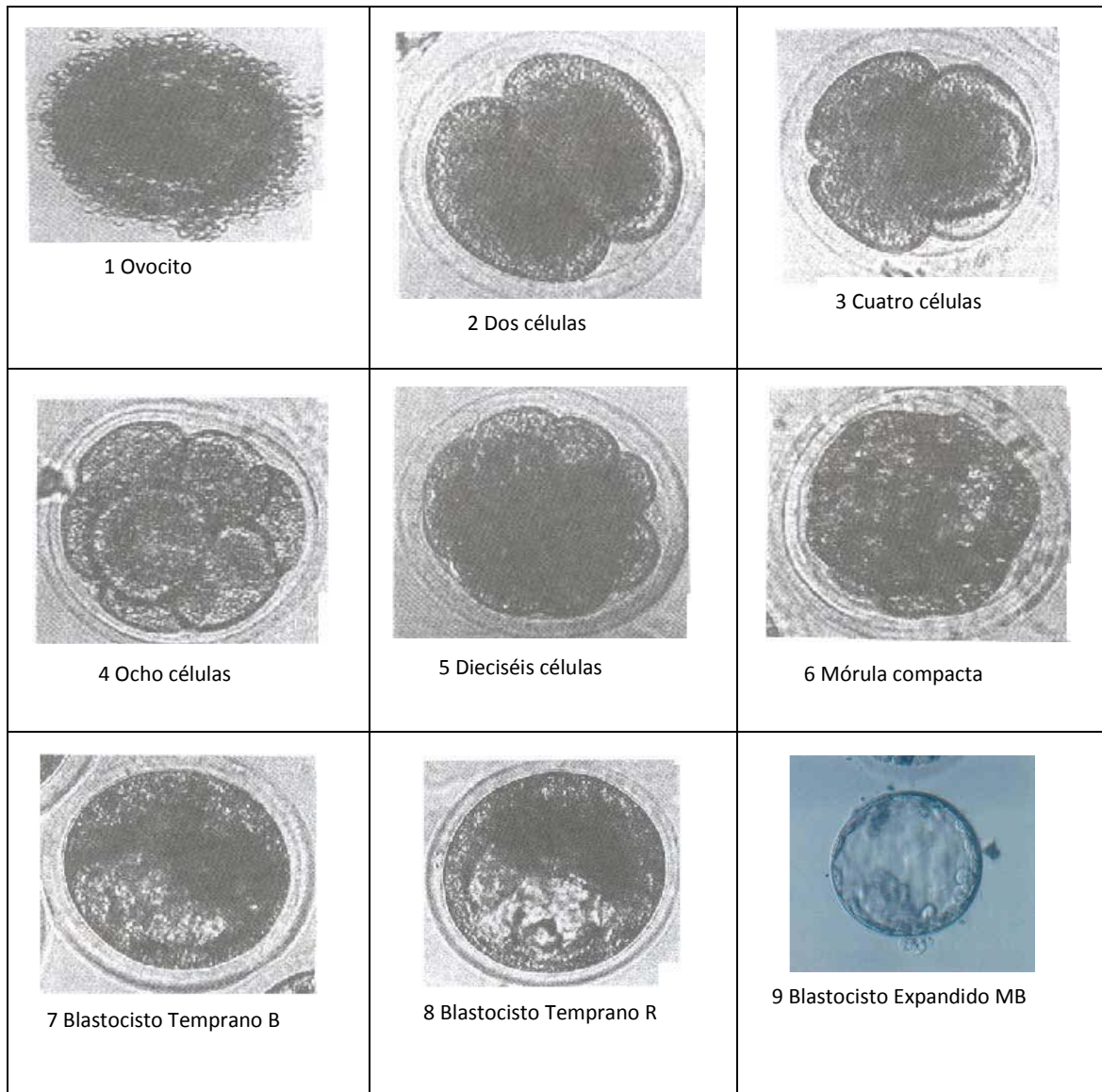
Citado en CLADEAD., (2008).

2.12. MORFOLOGÍA EMBRIONARIA

Debido a que en las donantes superovuladas, la ovulación no ocurre al mismo tiempo sino en cascada, cuando los embriones mediante el lavado uterino en los días 7 – 8 después de la primera inseminación artificial, vamos a encontrar diversos estados de desarrollo. En estos días deberíamos encontrar solamente Blastocistos y Blastocistos expandidos, citado por Palma (2008).

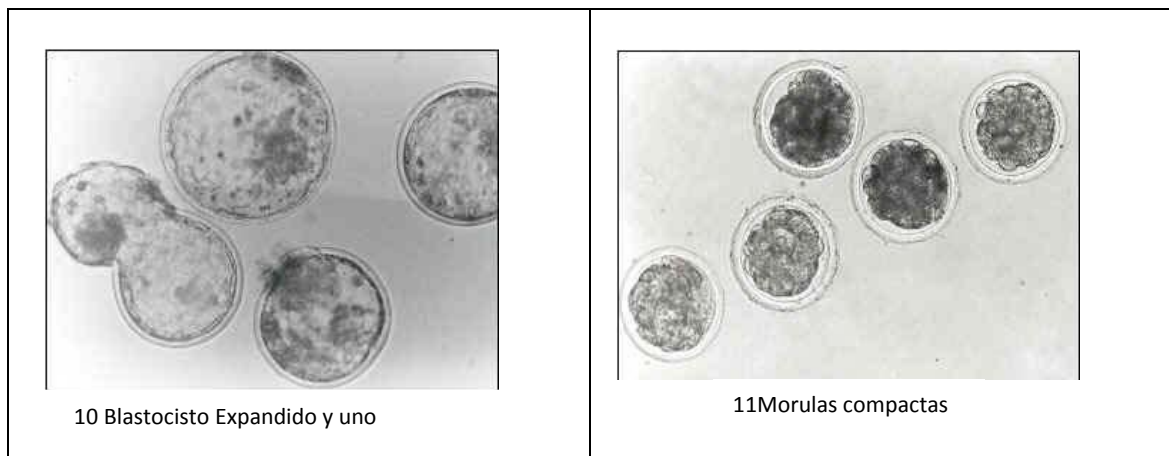
Según Palma (2008). Es conveniente recordar que en el día 9 el embrión rompe la zona pelúcida (eclosiona), o sea queda desprotegido sobre todo de virus y bacterias (la legislación de la Asociación de Trasplante de Embriones 'IETS', no permite congelarlos).

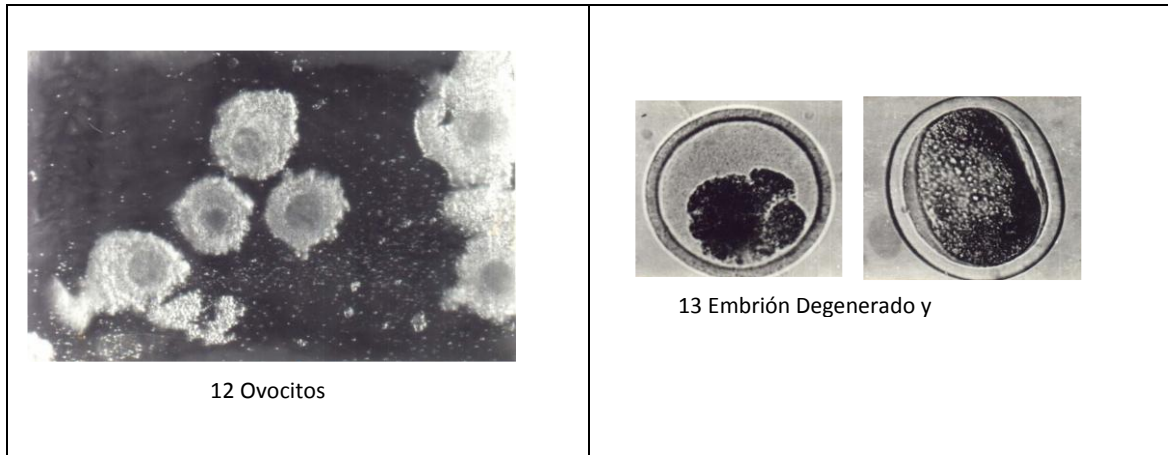
Podemos encontrar también blastocistos jóvenes y mórulas compactas. Si los embriones son de buena calidad en esos estadios se pueden transferir o congelar, embriones de calidad regular es conveniente implantarlos, aunque el porcentaje de gestación va a ser menor (Palma., 2008).



Fuente: Bó, et, al., 2010.

Figura 4. Embriones en diferentes estados de desarrollo





Fuente: CLADEAD 2008.

Figura 5. Estructuras embrionarias.

2.13. CRITERIOS MORFOLÓGICOS

- La zona pelúcida (membrana que rodea a el embrión), debe ser perfectamente esférica citado por Palma (2008).
- Si son mórulas compactas y por tanto no se ha formado el espacio interno llamado blastocelo y la capa de células que va a rodear al embrión (trofoblasto), ni el macizo interno (cuyas células son totipotentes), que caracteriza a los blastocistos, el embrión debe ser esférico, sin células extruidas (se admiten unas pocas células) y su color es oscuro homogéneo, citado por Palma (2008).
- Los blastocitos por tener las estructuras antes mencionadas deben verse un tanto traslúcidos, esféricos y sin células extruidas citado por Palma (2008).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Materiales de Oficina

- Computador.
- Cámara fotográfica.
- Cámara filmadora.
- Impresora.
- Hojas A4 para impresión.
- Registros de campo.
- Grabadora de voz para documentación.
- Bolígrafos y Lápices
- Tablas de registro.

3.1.2. Materiales de Campo

- Dos hembras bovinas Charolaise.
- Dos hembras bovinas Brown swiss.
- Una manga para inmovilización de las donantes.
- Agua limpia suficiente.
- Caja de guantes de chequeo ginecológico.
- 250 cc. de Gel lubricante.
- Overoles para trabajo.
- Jabón para lavado
- Cuatro litros de yodo.
- Recipientes limpios.
- Ocho sondas Foley
- Ocho filtros Emcon filter.
- Ocho rollos de toallas scot.
- Frasco de xilocaina al 2 %.

- Agujas y jeringuillas descartables.
- Cuatro pinzas hemostáticas.
- Dos tijeras quirúrgicas.
- Ocho litros de vigo complete flush solution (Bioniche Animal Health).
- Dieciséis jeringas para lavados de 60 cc.
- Estilete Bioniche revestido con protección de acero inoxidable.
- Un litro de agua destilada.
- Un litro de alcohol industrial.

3.1.3. Materiales de Laboratorio.

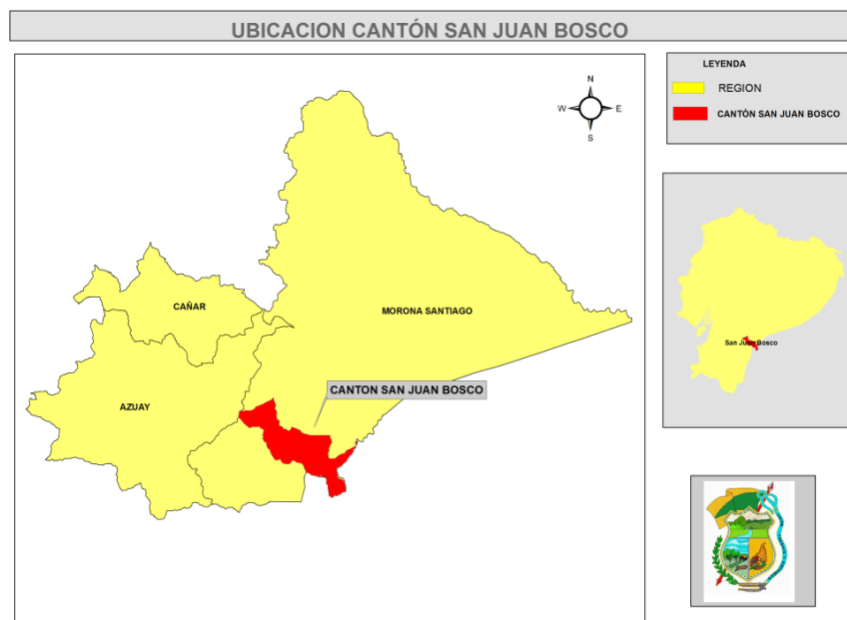
- Un estéreo microscopio.
- Una micropipeta.
- Puntas descartables para micropipeta.
- 180 ml de Holding.
- 60 ml de Freeze Medium
- Cajas Petri cuadrículadas.
- Cajas Petri divididas en 4 pozos.
- Un sistema para llenado de pajillas.
- Un Congelador Freeze control.
- Cinco kilos de Nitrógeno líquido.
- Un termo con nitrógeno líquido.
- Ocho Canastillas vacías y esterilizadas.
- Reloj temporizador.
- Marcadores de rotulación
- Pajillas vacías irradiadas 0,25 ml.
- Plugs para las pajillas 0,25 ml.
- Autoclave o esterilizador.
- Agua destilada.
- Alcohol industrial.
- Cloro.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Descripción del Lugar de la Investigación.

3.2.1.1. Ubicación de la investigación

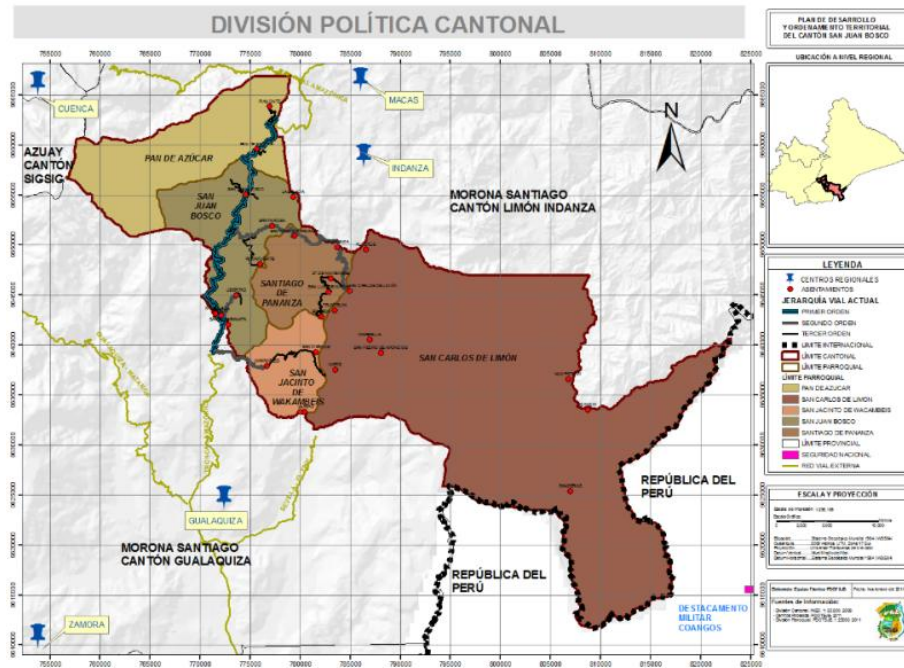
San Juan Bosco es uno de los doce cantones de la Provincia de Morona Santiago, se ubica al sur oriente de la región amazónica ecuatoriana, sus límites son: Al norte con el Cantón Limón Indanza, al Sur con el cantón Gualaquiza y la república del Perú, al este con la república del Perú, y al oeste con el cantón Sígsig de la provincia del Azuay.



Fuente: Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón San Juan Bosco, 2011
Figura 6. Ubicación del cantón San Juan Bosco en la región Amazónica.

3.2.1.2. División política administrativa

El Cantón San Juan Bosco está conformado por una parroquia urbana denominada San Juan Bosco y 4 parroquias rurales, conocidas como: Pan de Azúcar, Santiago de Pananza, San Jacinto de Wakambeis y San Carlos de Limón.



Fuente: Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón San Juan Bosco, 2011
 Figura 7. División política del cantón San Juan Bosco.

3.2.1.3. Clima

En general, el área de estudio se caracteriza por ser húmeda y muy húmeda, como efecto de las altas precipitaciones y constante nubosidad manifiestas durante todo el año.

El alto porcentaje de humedad relativa, generado por la exuberante vegetación y sumada a la humedad procedente de la faja amazónica acarreada por los vientos alisios, es la causa de la ocurrencia de las grandes precipitaciones.

La temperatura presenta un gradiente alto térmico, varía en función de la topografía, registrando valores que se incrementan conforme se desciende a la parte baja (Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2011 GADM de San Juan Bosco).

3.2.1.4. Precipitación

Con respecto a la precipitación podemos anotar que esta tiene un rango total al año que va desde los 1763,9 a los 5160 mm y con un promedio de 3461 mm de precipitación, siendo los meses de mayor pluviosidad de abril a junio y el de menor presencia de lluvias es el mes de enero (Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2011 GADM de San Juan Bosco).

3.2.1.5. Temperatura

El factor temperatura está relacionado de manera indirecta con la altitud, es decir, aumenta conforme se desciende en altura, de ahí que la temperatura alcanza valores alrededor de 16-22°C, y la variación mensuales de alrededor de 2°C, con rangos entre 20,9°C en el mes menos cálido (julio) y 22,5 °C en los meses más cálidos (noviembre-diciembre). La temperatura presenta un gradiente alto térmico, varía en función de la topografía, registrando valores que se incrementan conforme se desciende a la parte baja. La temperatura promedio anual es de 22.46 grados centígrados, presentando a lo largo del año rangos de temperatura que van desde los 21 a los 23.5 o C (Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2011 GADM de San Juan Bosco).

3.2.1.6. Humedad relativa

La Humedad relativa presente en la zona de estudio está directamente relacionada con la precipitación, el promedio anual es de 81,95, valores que muestran mayor significancia en los meses de junio y julio, en tanto que esta baja al final del año.

Los valores tabulados dentro de las dos estaciones analizadas e inferidas al cantón San Juan Bosco, presentan un promedio de 80.1 % con valores promedios máximos superiores al 85%.

Este factor se encuentra influenciado por efectos producidos por la densa vegetación y por las altas y constantes precipitaciones, justificándose por tanto, los valores altos durante todo el año.

En general, el área de estudio se caracteriza por ser húmeda y muy húmeda, como efecto de las altas precipitaciones y constante nubosidad manifiestas durante todo el año.

El alto porcentaje de humedad relativa, generado por la exuberante vegetación y sumada a la humedad procedente de la faja amazónica acarreada por los vientos alisios, son la causa de la ocurrencia de las grandes precipitaciones (Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2011 GADM de San Juan Bosco).

3.2.2. Ubicación de las Haciendas.

3.2.2.1. Hacienda La Libertad.

Se encuentra Ubicada en el sector la Victoria, en la parroquia de San Juan Bosco, cantón San Juan Bosco, Provincia de Morona Santiago a 3,17 km del centro cantonal vía San Juan Bosco – Indanza en las coordenada 775337N y 9657456E

3.2.2.2. Hacienda El Progreso.

Se encuentra ubicado en la parroquia San Juan Bosco, cantón San Juan Bosco, provincia de Morona Santiago a 8,6 km del centro cantonal por la vía San Juan Bosco – Gualaquiza en las coordenadas 773220N y 9651122E.



Fuente: Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón San Juan Bosco, 2011.
 Figura 8. Ubicación Geográfica de las haciendas.

3.2.3. Ubicación del Laboratorio.

El Laboratorio se encuentra ubicado en el centro del cantón San Juan Bosco específicamente en el sector del Barrio norte, cuenta con una instalación de 3 por 4 metros de superficie, con instalaciones de energía eléctrica, agua potable y condiciones para realizar los procesos biotecnológicos reproductivos de lavado de filtros, búsqueda, clasificación, empajillado y congelación de embriones, manteniendo en todos estos procesos niveles altos de asepsia.

3.2.4. Unidad Experimental.

Se consideró como unidad experimental (UE) en la presente investigación a una hembra bovina de la raza Charolaise o Brown swiss; con una condición corporal de 2.8 a 3 (foto 3); consideradas en la finca de gran valor genético; con una edad entre 3 a 5 años; que se encuentran ciclando normalmente; con más de 60 días de posparto; que gozan de perfecto estado de salud, libres de parásitos y aplicadas vitaminas, minerales (especialmente fosforo) y vacunas,

con por lo menos 21 días antes a la fecha de inicio de la investigación, para lo cual se tiene los registros de cada donante identificado en anexos 1 y 5.



Donadora Charolaise
Bluegrass Enriqueta



Donadora Charolaise
Ohalix Kika



Donadora Brown
swiss Ace Bárbara



Donadora Brown swiss
Cartoon Preciosa

Fuente: Carlos Arévalo 2013.

Figura 9. Donadoras Charolaise y Brown swiss.

3.2.5. Tamaño de la Muestra y Distribución de los Tratamientos.

La cantidad de UE fue de 8 lavados de embriones, con dos factores: Razas y protocolos de superovulación. Dos niveles en cada uno de ellos y realizando dos repeticiones en cada nivel, en un diseño: $2 \times 2 \times 2 = 8$ UE.

Cuadro 2. Diseño de la Unidad Experimental.

FACTOR	NIVEL	Tratamientos	# repeticiones/tratamiento
Razas	Brown swiss (Br)	T1Br	2
	Charolaise (Ch)	T2Br	2
Protocolos de superovulacion	Tratamiento convencional con estradiol (T1)	T1Ch	2
	Tratamiento CIDR 12 días sin Estradiol (T2)	T2Ch	2
TOTAL	2	4	8

Fuente: Carlos Arévalo, 2012.

3.2.6. Descripción De Los Protocolos Empleados.

Cuadro 3. Protocolo convencional para hembras donantes T1.

DIA	FECHA	HORA	TRATAMIENTO	Folltropin Charolaise	Folltropin Brown swiss
0		6:00	Disp. P4 + 50 mg P4 + 2.5 mg EB		
4		6:00		2,5 ml	2,5 ml
		18:00		2,5 ml	2,5 ml
5		6:00		2,5 ml	2,5 ml
		18:00		2,5 ml	2,5 ml
6		6:00	PGF	2,5 ml	2,5 ml
		18:00	PGF	2,5 ml	2,5 ml
7		6:00	Retirar dispositivo	2,5 ml	2,5 ml
		18:00		2,5 ml	2,5 ml
8		6:00	2 ml de GnRH		
		18:00	I.A.		
9		6:00	I. A.		
15			COLECTA DE EMBRIONES		

Fuente: Carlos Arévalo, 2012.

Cuadro 4. Protocolo CIDR de 12 días para hembras donantes T2.

DIA	FECHA	HORA	TRATAMIENTO	Folltropin Charolaise	Folltropin Brown swiss
-8		6:00	Disp. P4 CIDR.		
-1		6:00	2 ml de GnRH		
		18:00			
1		6:00		2,5 ml	2,5 ml
		18:00		2,5 ml	2,5 ml
2		6:00		2,5 ml	2,5 ml
		18:00		2,5 ml	2,5 ml
3		6:00		2,5 ml	2,5 ml
		18:00	PGF 2ml.	2,5 ml	2,5 ml
4		6:00	PGF 2ml. Remoción de CIDR.	2,5 ml	2,5 ml
		18:00	pLH	2,5 ml	2,5 ml
5		6:00			
		18:00	Inseminación A.		
6		6:00	Inseminación A.		
12			COLECTA DE EMBRIONES		

Fuente: Carlos Arévalo, 2012.

3.2.7. Factores que se Evaluaron en la Investigación

Los factores que se evaluaron son:

- Numero de estructuras (folículos y cuerpos lúteos) presentes en los ovarios.
- Número y calidad de embriones recolectados.
- Numero de mórulas y blastocitos (calidad 1) para criocongelación.
- Costo de embrión congelado y en fresco.

3.2.8. Diseño Estadístico

Una vez finalizada la investigación y obtenidos los resultados, se procedió a tabular los mismos en base a cada una de las variables investigadas aplicando un análisis de varianza ADEVA .

3.2.9. Metodología de Inicio de la Investigación.

La investigación se inició con las hembras de la raza Charolaise en la Hacienda La Libertad de propiedad del Sr. Hernán Vásquez y posteriormente siguiendo la misma metodología y actividades se trabajó con las donadoras Brown swiss en la hacienda El Santo del Sr. Ignacio Campoverde cumpliendo las siguientes actividades:

3.2.9.1. Ecografía inicial:

Para el Inicio de los tratamientos SOP y para mantener la seguridad sobre la situación inicial del tracto reproductivo, se procedió a realizar un examen ecográfico (Ecógrafo E&I Medical®) con sonda rectal lineal a cada una de las hembras seleccionadas, teniendo por resultados lo siguiente:



Ecógrafo E&I Medical®



Ecografía 1. Enriqueta, Ovario Izquierdo



Ecografía 2. Enriqueta: Ovario Derecho



Ecografía 3. Enriqueta: Cuernos y cuerpo uterino.



Ecografía 4. Kika: Ovario Izquierdo



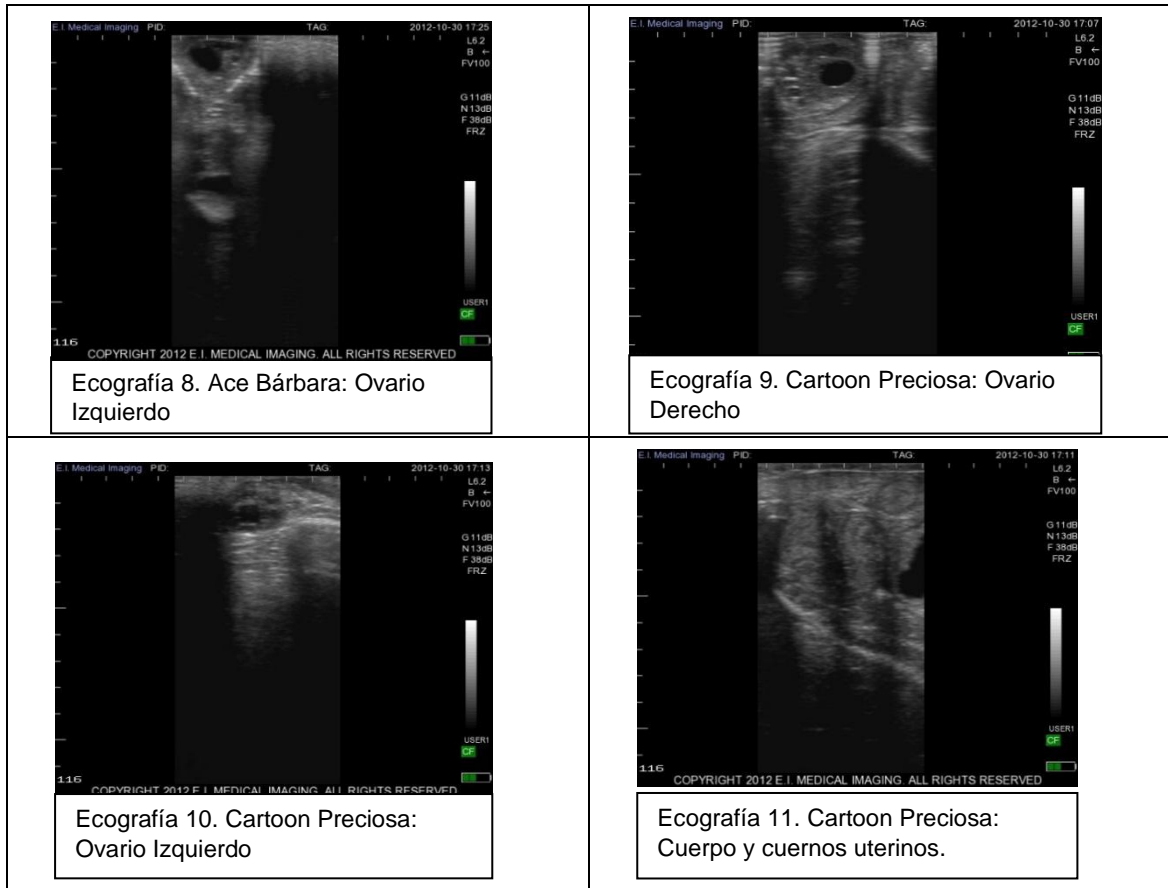
Ecografía 5. Kika: Ovario Derecho



Ecografía 6. Kika: Cuerpo y cuernos



Ecografía 7: Ace Bárbara: Ovario Derecho



Fuente: Ovarios de las donantes; ecografías tomadas con Ecógrafo E&I Medical®. 2013.

Figura 10. Imágenes ecográficas de ovarios y tracto genital de donadoras al inicio de la Súper ovulación programada (SOP).

Cuadro 5. Interpretación de las imágenes ecográficas de ovarios y tracto genital de las donadoras al inicio de los tratamientos SOP.

Donadora	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Cuernos y útero
Charolaise: Bluegrass Enriqueta	Tipo ovalado de 34 mm de largo por 18 mm de ancho. Folículo: Siete folículos en crecimiento. No presenta cuerpo lúteo.	Tipo ovalado de 40 mm de largo y 33 mm de ancho. Folículo: 16 folículos en crecimiento, un folículo presente retenido. No presenta cuerpo lúteo.	Cuerpo limpio y cuernos cerrados
Charolaise: Obelix Kika	Tipo ovalado de 20mm de largo por 19 mm de ancho. Tres folículos en crecimiento y uno dominante. No presenta cuerpo lúteo.	Tipo ovalado de 28 mm de largo y 23 mm de ancho. No se notan los folículos en crecimiento. Presenta un cuerpo lúteo de gran tamaño y bien desarrollado.	Cuerpo limpio y cuernos cerrados.
Brown swiss: Ace Bárbara	Tamaño de 30 mm de largo por 15 mm de ancho, tipo ovalado. Folículos en crecimiento. No presenta cuerpo lúteo.	Tamaño 70 cm de largo por 30 cm de ancho de tipo ovalados. Presenta cuerpo lúteo de 2 cm de largo por 2 cm de ancho. No presenta folículos.	Cuerpo limpio y cuernos cerrados.
Brown swiss: Cartoon Preciosa	Tipo ovalado de 20 mm de largo por 10 mm de ancho. Presencia de folículos en crecimiento. No presenta cuerpo lúteo.	Tipo ovalado de 40 mm de largo y 20 mm de ancho. Presenta un cuerpo lúteo de tipo cavitáreo. Presencia de folículos en diferentes etapas.	Cuerpo limpio y cuernos cerrados.

Fuente: Carlos Arévalo, 2012.

3.2.9.2. Descripción de los protocolos empleados.

Cuadro 6. Protocolo convencional para hembras donantes tratamiento 1.

DIA	FECHA DONANTE CHAROLAIS	FECHA DONANTE BROWN SWISS	HORA	TRATAMIENTO	FOLLTROPIN CHAROLAIS	FOLLTROPIN BROWN_SWISS
0	jueves, 19 de abril de 2012	viernes, 16 de noviembre de 2012	6:00	Disp. P4 + 50 mg P4 + 2.5 mg EB		
4	lunes, 23 de abril de 2012	martes, 20 de noviembre de 2012	6:00		2,5 ml	2,5 ml
			18:00		2,5 ml	2,5 ml
5	martes, 24 de abril de 2012	miércoles, 21 de noviembre de 2012	6:00		2,5 ml	2,5 ml
			18:00		2,5 ml	2,5 ml
6	miércoles, 25 de abril de 2012	jueves, 22 de noviembre de 2012	6:00	PGF	2,5 ml	2,5 ml
			18:00	PGF	2,5 ml	2,5 ml
7	jueves, 26 de abril de 2012	viernes, 23 de noviembre de 2012	6:00	Retirar dispositivo	2,5 ml	2,5 ml
			18:00		2,5 ml	2,5 ml
8	viernes, 27 de abril de 2012	sábado, 24 de noviembre de 2012	6:00	2 ml de GnRH		
			18:00	I.A.		
9	sábado, 28 de abril de 2012	domingo, 25 de noviembre de 2012	6:00	I. A.		
15	viernes, 04 de mayo de 2012	sábado, 01 de diciembre de 2012	COLECTA DE EMBRIONES			

Fuente: Carlos Arévalo, 2013.

Cuadro 7. Protocolo CIDR 12 días sin estrógenos para hembras donantes tratamiento 2.

DIA	FECHA DONANTE CHAROLAIS	FECHA DONANTE BROWN SWISS	HORA	TRATAMIENTO	FOLLTROPIN CHAROLAIS	FOLLTROPIN BROWN_SWISS
-8	viernes 06 de julio del 2012	sábado, 23 de febrero de 2013	6:00	Disp. P4 CIDR.+ 50 mg P4		
-1	viernes 13 de julio 2012	viernes, 01 de marzo de 2013	6:00	5 ml de GnRH (fertagyl)		
			18:00			
1	domingo 15 de julio del 2012	domingo, 03 de marzo de 2013	6:00		2,5 ml	2,5 ml
			18:00		2,5 ml	2,5 ml
2	lunes 16 de julio del 2012	lunes, 04 de marzo de 2013	6:00		2,5 ml	2,5 ml
			18:00		2,5 ml	2,5 ml
3	martes 17 julio del 2012	martes, 05 de marzo de 2013	6:00		2,5 ml	2,5 ml
			18:00	PGF 2ml. (Clorprostenol)	2,5 ml	2,5 ml
4	miércoles 18 julio del 2012	miércoles, 06 de marzo de 2013	6:00	PGF 2ml. (Clorprostenol) Remoción de CIDR.	2,5 ml	2,5 ml
			18:00	5 ml de GnRH(Fertagyl)	2,5 ml	2,5 ml
5	jueves 19 de julio del 2012	jueves, 07 de marzo de 2013	6:00			
			18:00	Inseminación A.		
6	viernes 20 de julio del 2012	viernes, 08 de marzo de 2013	6:00	Inseminación A.		
12	Jueves 26 de julio del 2012.	jueves, 14 de marzo de 2013	COLECTA DE EMBRIONES			

Fuente: Carlos Arévalo, 2013.

3.2.9.3. Inseminación de las donantes

Cuadro 8. Características del semen empleado en la doble inseminación artificial de las donantes.

Donadoras		Semen empleado	
Raza	Nombre	Protocolo 1	Protocolo 2
Charolaise	Bluegrass Enriqueta	Jumper Relax FR7121100262 (Francés)	Major Petit Prince 5811599535 (Alta selección francesa)
Charolaise	Obelix Kika	Cedardale Rebel 3R 200CH0102 (Canadiense)	Cedardale Rebel 3R 200CH0102 (Canadiense)
Brown swiss	Ace Barbara	Wondermen Tambark 54BS486 (USA).	Triangle Acres Payoff ET 014BS00288 (USA).
Brown swiss	Cartoon Preciosa	Wondermen Tambark 54BS486 (USA).	Triangle Acres Payoff ET 014BS00288 (USA).

Fuente: Carlos Arévalo, 2013.

3.2.9.4. Recolección de embriones

Los embriones se recogieron siete días después de cada inseminación de las donantes, previo a la colecta, se realizó un chequeo ecográfico para determinar la respuesta a los SOP, en cuanto a número de estructuras ováricas presentes en cada ovario (cuerpos lúteos y folículos anovulatorios), en toda esta etapa se tuvo la asistencia del equipo técnico del CEBIREA- Universidad Nacional de Loja y del Director del Proyecto de Tesis, quienes apoyaron el proceso a nivel de campo y laboratorio.

3.2.9.5. Actividades a nivel de campo

- Evacuación de heces, limpieza, desinfección y secamiento de la zona perineal del animal.
- Anestesia a nivel de la zona epidural alta, dependiendo del peso del animal se colocó entre 8 a 12 ml de xilocaína al 2%.
- Dilatación física del cérvix, introduciendo un dilatador metálico.

- Colocación de la sonda Foley: para la raza Charolaise se empleó sondas tipo Foley calibre FR 18 de silicón y para las donadoras Brown swiss, se empleó Foley calibre FR 14 de silicón.
- Inflado del balón de la sonda a nivel de la curvatura mayor de cada cuerno, para el caso de las donadoras Charolaise los úteros son de considerable tamaño para lo cual se emplea entre 10 a 12 ml de agua bidestilada, en tanto que para las Brown swiss se empleó 5 a 8 ml de agua destilada.
- Retiro de stilet o mandril suavemente.
- Conexión del Ytubing para el proceso de lavado en circuito continuo pasando paulatinamente volúmenes variables de PBS en etapas en un volumen total de 400 ml por cuerno y recogiendo el líquido evacuado de los cuernos en un filtro plástico especial para embriones tipo EMCOM determinado en la foto 4.
- Colocación de prostaglandina $PGF_{2\alpha}$ a las donadoras con la finalidad de eliminar los cuerpos lúteos y detener la preñez en dosis de 2ml de Estrumate® (Clorprostenol).
- Traslado del filtro al Laboratorio, una vez terminado el trabajo de campo se traslada el mismo con líquido proveniente de los cuernos uterinos con los embriones, lo más rápido posible al laboratorio, protegiéndolo del sol.



Anestesia epidural.



Introducción de la sonda Foley.



Fuente: Carlos Arévalo, 2012.

Figura 11. Secuencia del trabajo de campo para la obtención de embriones.

3.2.9.6. Actividades a nivel de laboratorio.

- Lavado de los filtros, previo a esta actividad, es necesario rotular los mismos con el nombre de la correspondiente donante, luego los filtros son lavados con PBS, empleando para ello una jeringa de 20 ml y a presión constante de tal manera que los embriones se despeguen de la base de los filtros.

- Colocación en Cajas Petri plásticas cuadrículadas del líquido procedente de los filtros y del lavado a presión con jeringa de los mismos, así también estas Cajas fueron rotuladas con la finalidad de identificar la muestra y a que donante pertenece.
- Búsqueda de los embriones en un estereoscopio Meiji® EMZ-8TR Trinocular Stereo Zoom, cada muestra fue minuciosamente revisada de arriba para abajo y luego a los lados, capturando los embriones con una micropipeta y colocando los mismos en una Caja Petri pequeña de dos pocillos que contiene medio Holding hasta terminar de revisar toda la muestra.
- Calificación de los embriones en el medio Holding, considerando el grado de desarrollo y calidad, separando los embriones grado 1 y 2 para su congelación y eliminación los de grado 3 o infertilizados.
- Lavado de los embriones, una vez evaluados se procede al lavado según la metodología establecida por la IETS (International Embryo Transfer Society's), con 10 gotas de Holding.
- Rotulación de los plugs con la información correspondiente a cada embrión (padre, donadora, calidad del embrión, fecha de congelación) en las pajuelas donde irán colocados los mismos.
- Preparación del medio e freezer (etilen glicol), previo a la colocación de los embriones en este medio, se lo calienta sobre una platina térmica (32°C) y procedemos a llenar las pajillas antes de 5 minutos, evitando que los embriones estén más de este tiempo en Etilen Glicol, para evitar una deshidratación excesiva.
- Llenado de las pajillas mediante la metodología de etilen glicol, aire, etilen glicol, aire más el embrión, columna de aire, etilen glicol, aire y etilen glicol, luego se lo sella con el plug rotulado según el embrión correspondiente.
- Proceso de crio congelación, los embriones empajillados fueron colocados inmediatamente en el congelador Crío- System®, el cual se encuentra a una temperatura de -6°C, una vez colocados todos los embriones se realiza el seeding a los 10 minutos y se da inicio al descenso de la temperatura, para ello al Criocongelador se lo programó con el programa N° 6, correspondiente a congelación de embriones de bovinos, durante 68 minutos hasta llegar a -40°C.

- Colocación de los embriones en el termo de mantención en nitrógeno líquido hasta su transferencia.



Laboratorio para evaluación de embriones.



Laboratorio para embriones búsqueda de embriones.



Búsqueda de la segunda muestra bajo estereoscopio Mejiic.



Clasificación de los embriones.



Colocación en medio de holding.



Sistema de congelación.



Equipo en proceso de congelación de embriones.



Equipo de trabajo para la primera prueba.

Fuente: Carlos Arévalo, 2012.

Figura 12. Secuencias de las actividades realizadas en el laboratorio con apoyo de CEBIREA.

4. RESULTADOS

4.1. NUMERO DE ESTRUCTURAS PRESENTES EN LOS OVARIOS MEDIANTE SUPEROVULACIÓN PROGRAMADA.

Para la determinación de esta variable, se realizó la ecografía al día 7 previa a la realización de la colecta de embriones, lo que permitió tener un dato aproximado del número de estructuras que se podían colectar, obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 9. Numero de estructuras ováricas encontradas en los tratamientos SOP investigados en donadoras Charolaise y Brown Swiss.

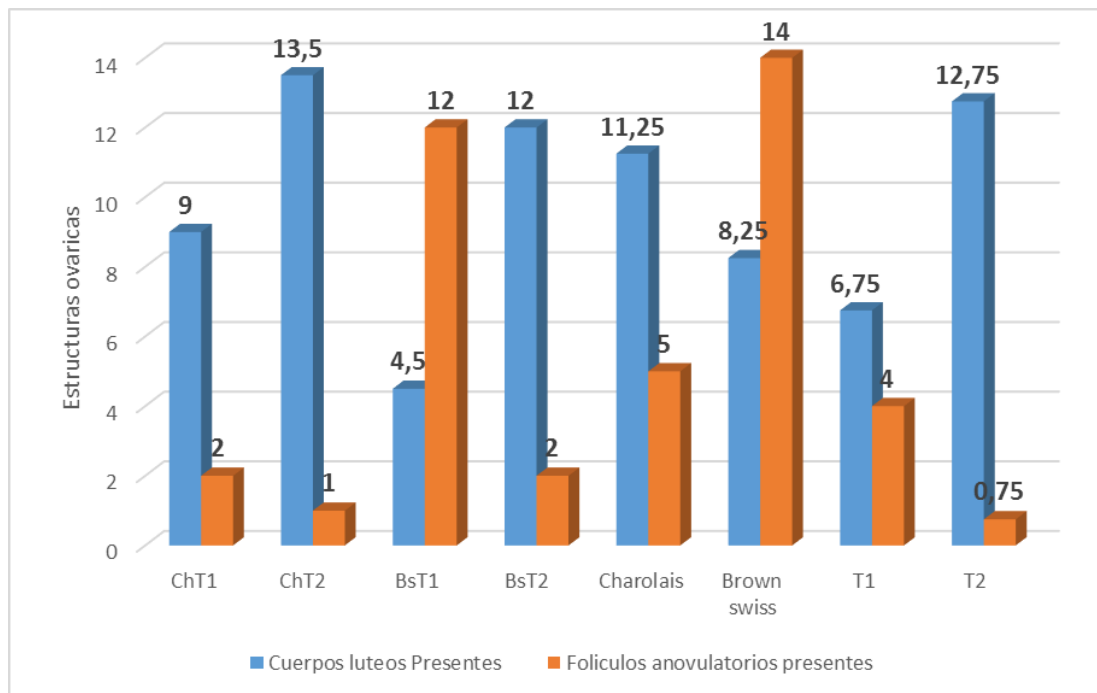
		Cuerpos lúteos			
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Total	Promedio
Charolaise	T1	5	13	18	9 ^b
	T2	11	16	27	13,5 ^a
Brown swiss	T1	9	0	9	4,5 ^c
	T2	12	12	24	12 ^{ab}
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaise	45	11,25 ^a	T1	27	6,75 ^b
Brown swiss	33	8,25 ^{ab}	T2	51	12,75 ^a
		Folículos anovulatorios			
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Total	Promedio
Charolaise	T1	3	1	4	2 ^b
	T2	1	0	1	0,5 ^c
Brown swiss	T1	1	11	12	6 ^a
	T2	2	0	2	1 ^c
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaise	5	1,25 ^b	T1	16	4 ^a
Brown swiss	14	3,5 ^a	T2	3	0,75 ^b

Fuente: Investigación de campo 2013.

Elaborado por: Carlos Arévalo S.

Como se puede apreciar en el cuadro 9, los mejores resultados en cuanto a la producción de CL por donadora, se han obtenido en aquellas que se les aplicó el tratamiento 2, con un promedio por donadora de 12,75 CL, frente al tratamiento 1 en donde se obtuvo un promedio de 6.75 CL. En lo que corresponde a la raza, se obtuvo una mejor respuesta en las donadoras Charolaise con un promedio de 11.25 CL, frente a las Brown Swiss con un promedio por donadora de 8.25 CL.

Para la respuesta de folículos anovulatorios se puede determinar que en el tratamiento uno fue el que más folículos sin ovular se presentaron con un promedio de 4 folículos por donadora versus el tratamiento dos que resulto con un promedio de 0,75 folículos por donadora. Analizando la situación de raza diremos que las hembras Brown swiss fueron quienes más folículos retenidos tuvieron con un promedio de 3,5 folículos por donante, comparado con las hembras Charolaise que obtuvieron 1,25 folículos por donante.



Fuente: Investigación de campo 2013.

Figura 13. Estructuras ováricas presentes en la investigación.

Al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos para cuerpos lúteos, hay una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) para el tratamiento dos con un valor de 12,75 Cuerpos lúteos/UE, en relación al tratamiento uno con un promedio de 6,75 cuerpos lúteos/UE. Para la evaluación de raza tanto Charolaise como Brown Swiss no existe una diferencia estadística pero si una diferencia matemática en lo referente a promedio de cuerpos lúteos teniendo que para ganado Charolaise fue de 11,25 cuerpos lúteos en relación a la raza Brown swiss de 8,25 cuerpos lúteos/UE.

En el análisis de los resultados obtenidos para folículos anovulatorios, hay una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) para el tratamiento uno T1 con 4

folículos anovulatorios en promedio/UE comparado con el tratamiento T2 con 0,75 folículos en promedio/UE; en la presencia de folículos anovulatorios por raza también existe un nivel de significancia, con un mayor promedio de folículos sin ovular para el ganado Brown swiss con 3,5 folículos anovulatorios/UE, que el ganado Charolaise que produjo 1,25 folículos anovulatorios/UE.

4.2. NÚMERO DE EMBRIONES RECOLECTADOS.

Una vez realizado las actividades de campo se procedió a conducir las muestras hasta el laboratorio para realizar la evaluación de lo colectado en cada una de las donantes sometida a estos dos tratamientos de SOP en la investigación, según esto se obtuvo los siguientes resultados:

Cuadro 10. Embriones colectados por tratamientos y razas analizados en la investigación.

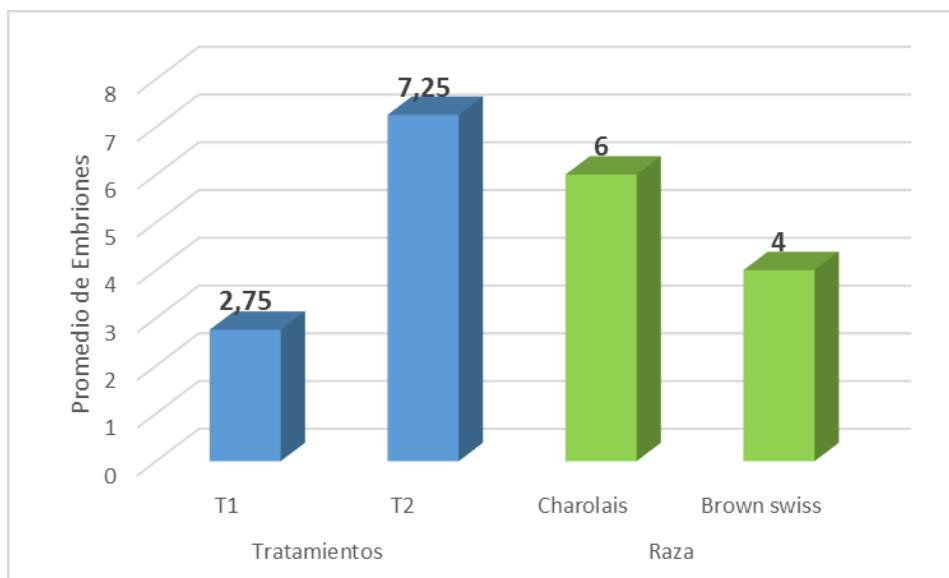
		Embriones			
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Total	Promedio
Charolaisee	T1	0	6	6	3 ^c
	T2	6	12	18	9 ^a
Brown swiss	T1	5	0	5	2,5 ^c
	T2	2	9	11	5,5 ^b
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaisee	24	6 ^a	T1	11	2,7 ^b
Brown swiss	16	4 ^{ab}	T2	29	7,25 ^a

Fuente: Investigación de campo 2013.

Elaborado por: Carlos Arévalo.

En el laboratorio se determinó que los resultados obtenidos para cuerpos lúteos, hay una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) para el tratamiento dos (T2) con promedio de producción de 7,25 embriones por donante en relación al tratamiento uno que resulto con 2.75 embriones /UE.

Al realizar el análisis estadístico considerando la raza de las donadoras, diremos que la producción de embriones para este factor, no es significativa, existiendo una diferencia matemáticamente en favor de la raza Charolaise con 6 embriones por donante, comparado con la raza Brown swiss con 4 embriones por UE.



Fuente: Investigación de campo 2013

Figura 14. Producción total de embriones obtenidos por tratamientos y razas analizados en la investigación.

Al establecer el análisis estadístico en la Figura 14 se deduce que los mejores resultados obtenidos de embriones por donante individual fue el del tratamiento dos de la Charolaise dos, con un promedio de 9 embriones/UE seguidos por la Brown swiss dos con el tratamiento dos con un promedio de 5,5 embriones/UE.

Al establecer el análisis estadístico en la gráfica se dice que los mejores resultados obtenidos de embriones por donante individual fueron los del tratamiento dos y en la raza Charolaise con un promedio de 9 y 6 embriones/UE respectivamente.

4.3. CALIDAD DE EMBRIONES RECOLECTADOS.

Una vez extraídos los embriones del medio PBS y colocados en Holding en el laboratorio manteniendo una temperatura de los medios de 30°C sobre una platina térmica se procedió a realizar su clasificación, considerando para ello los parámetros del IETS, obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 11. Calidad de los embriones colectados por tratamiento y razas analizados en la investigación.

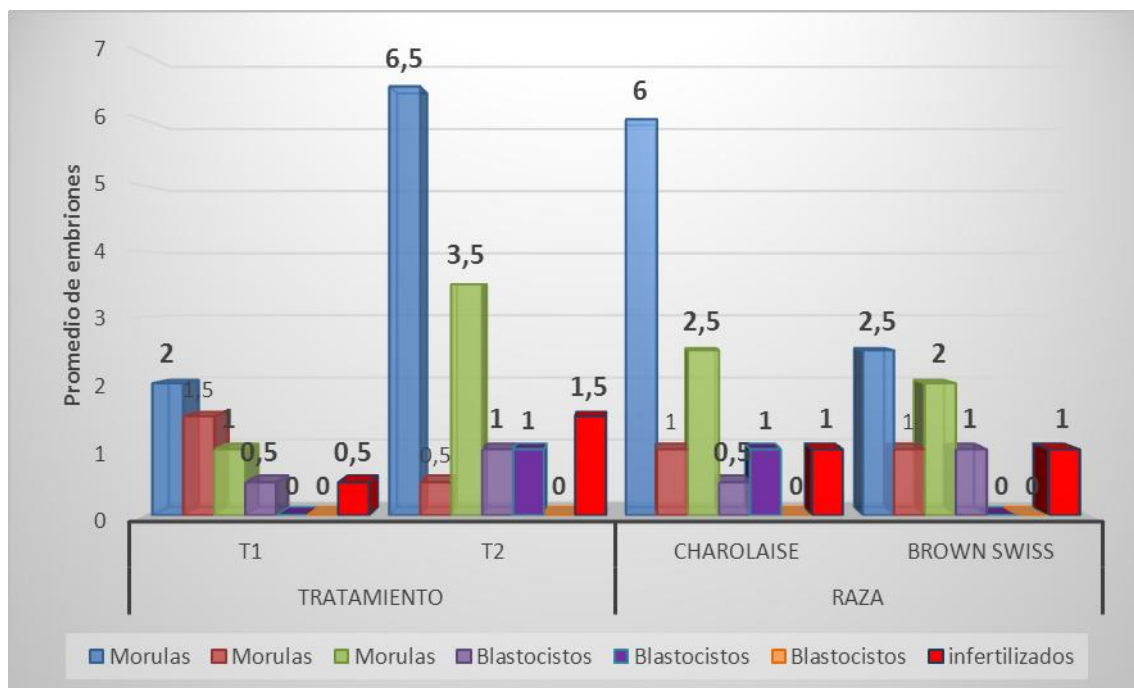
Raza	Tratamiento	Repetición	Embriones recolectados						
			Mórulas			Blastocistos			infertilizados
			Calid. 1	Calid. 2	Calid. 3	Calid. 1	Calid. 2	Calid. 3	
Charolais	T1	1	0	0	0	0	0	0	0
		2	3	2	0	0			1
	Promedio/donadora		1,5	1	0	0	0	0	0,5
	T2	1	1	0	1	1	2		1
		2	8	0	4	0	0	0	
Promedio/donadora		4,5	0	2,5	0,5	1	0	0,5	
Brown swiss	T1	1	0	0	0	0	0	0	0
		2	1	1	2	1	0	0	0
	Promedio/donadora		0,5	0,5	1	0,5	0	0	0
	T2	1	4	1	2	1	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	2
Promedio/donadora		2	0,5	1	0,5	0	0	1	

Fuente: Investigación de campo 2013.

Elaborado por: Carlos Arévalo S.

Para la clasificación de embriones transferibles se realizó mediante las normas dadas por la IETS, 2000 según ello se clasifico los grados 1, 2, 3 tanto en mórulas como blastocistos.

Según ello se tiene que las mejores producciones en mórulas resulto en el T2, tanto en Charolaise con 4.5, como en Brown swiss con 2 mórulas grado uno /UE; en cuanto a la producción de blastocistos, ambos tratamientos produjeron un promedio de 0.5 estructuras calidad 1/UE; es de destacar los 2.5 mórulas calidad 3 que produjeron en promedio las donadoras Charolaise en comparación a las donadoras Brown Swiss que produjeron un promedio de una mórula calidad 2 en ambos tratamientos; en cuanto a las estructuras infertilizadas los resultados son similares tanto en los tratamientos como en las razas analizadas, siendo el rango de 0.5 a 1 estructura infertilizada por donadora.



Fuente: Investigación de campo 2013.

Figura 15. Análisis de la calidad de embriones en la investigación.

En el análisis del grafico 3, se destaca el comportamiento en relación a la calidad de embriones evaluada según el IETS, 2000; se puede determinar independientemente de la raza, el mejor rendimiento obtenido en las donadoras a las que se les aplicó el tratamiento 2. Así también analizando el factor raza, se determinó mejor respuesta en cuanto a calidad de embriones obtenidos en la raza Charolaise frente a la Brown Swiss.

4.4. NUMERO DE MÓRULAS Y BLASTOCISTOS (CALIDAD 1) PARA CRIOCONGELACIÓN.

Una vez clasificadas y colocadas en cajas Petri bien identificadas se procedió durante la etapa de investigación a colocar por separado los resultados de las mejores mórulas y blastocistos para su criocongelación o su transferencia en fresco de esta manera se obtuvo los siguientes resultados:

Cuadro 12. Estructuras grado 1 (mórulas y blastocistos), por raza y tratamientos analizados en la presente investigación.

		Mórulas Grado uno			
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Total	Promedio
Charolaise	T1	0	3	3	1,5 ^b
	T2	1	8	9	4,5 ^a
Brown swiss	T1	0	1	1	0,5 ^c
	T2	4	0	4	2 ^b
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaise	12	3 ^a	T1	4	1 ^b
Brown swiss	5	1,25 ^b	T2	13	3,25 ^a
		Blastocistos Grado uno			
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Total	Promedio
Charolaise	T1	0	0	0	0
	T2	0	0	0	0
Brown swiss	T1	1	0	1	0,5
	T2	1	0	1	0,5
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaise	0	0	T1	1	0,25
Brown swiss	2	0,5	T2	1	0,25

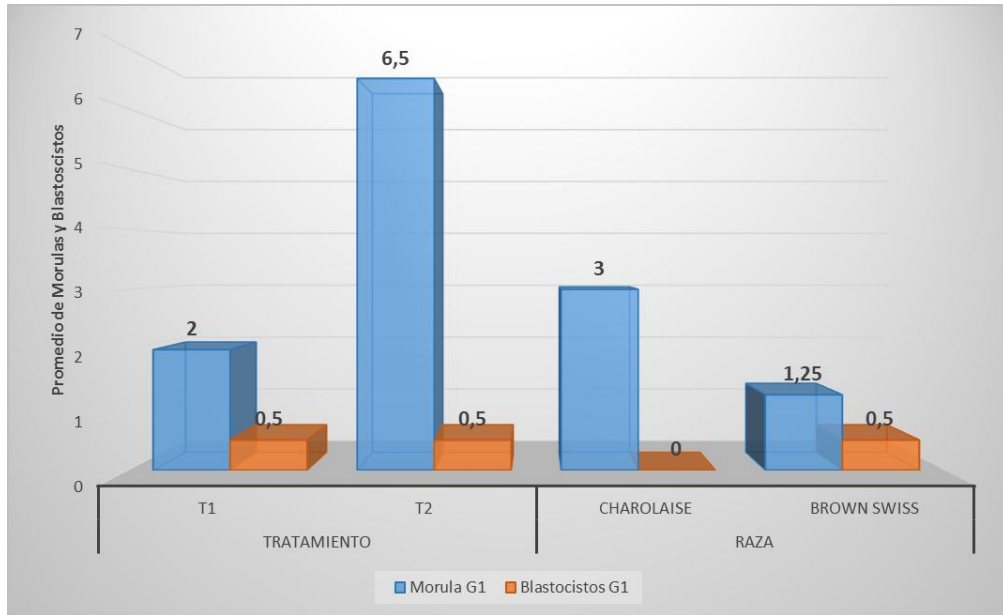
Fuente: Investigación de campo 2013.

Elaborado por: Carlos Arévalo S.

Según el análisis estadístico se deduce que no hay una diferencia estadística significativa para el tratamiento, pero si existe una diferencia matemática para el T2 con las mejores mórulas para criocongelación 3,25 embriones en mórulas/UE grado uno para criocongelación en relación al tratamiento uno con 1 mórula grado uno /UE para criocongelación.

Para los resultados de mórulas grado uno se indica que el mejor resultado produjeron las hembras Charolaise con promedios de 3 mórulas/UE en relación con las hembras Brown swiss con 1,25 mórulas grado uno/UE.

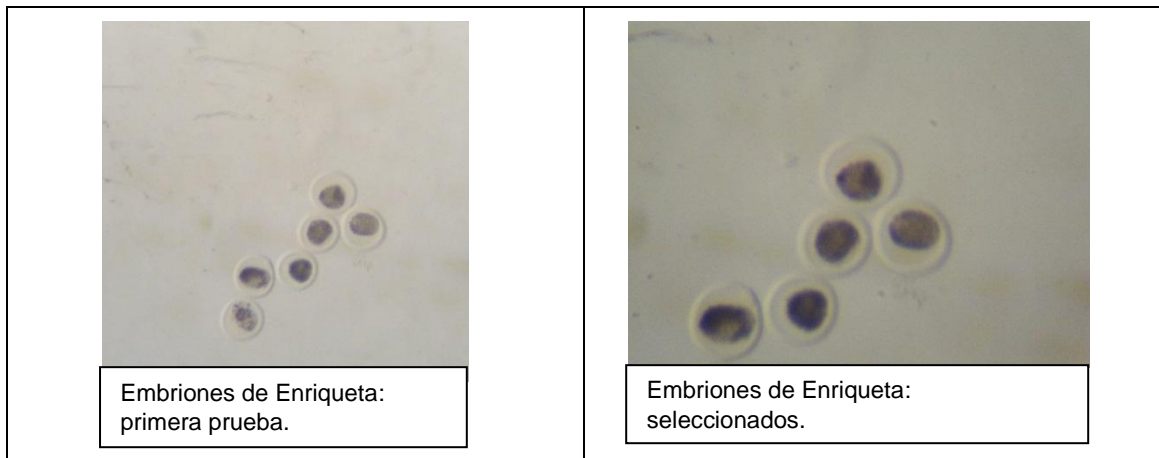
Para el caso de blastocistos estadísticamente no existe una diferencia significativa lo cual nos determina que tanto el T1 como el T2 presentaron igual número de blastocistos/UE, para el caso de las razas sostenemos que el resultado fue no significativo al no establecerse claramente una diferencia marcada.

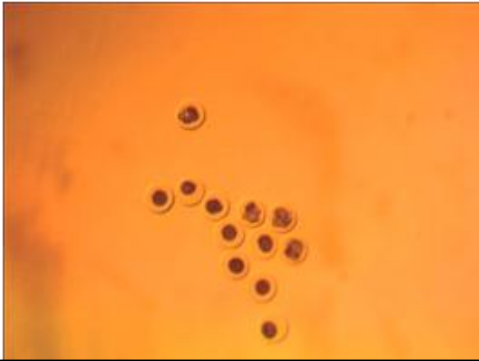


Fuente: Investigación de campo 2013.

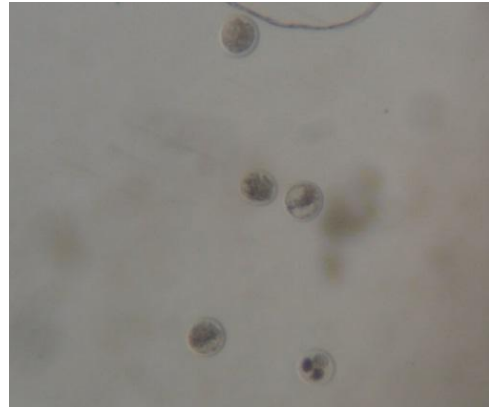
Figura 16. Análisis de producción de embriones grado 1 para mórulas y blastocistos.

Mediante el análisis claramente se determina en el gráfico 4, la diferencia entre tratamientos por su nivel de producción tanto de mórulas grado uno como blastocistos para la crioconservación o la transferencia en fresco, de estos resultados podemos decir que el mejor tratamiento relacionado con la respuesta de los animales, representa el Tratamiento dos y comparando el factor raza, existe influencia en favor de la Charolaise frente a la Brown Swiss, lo que puede deberse al estrés de la producción de leche de la Brown Swiss.

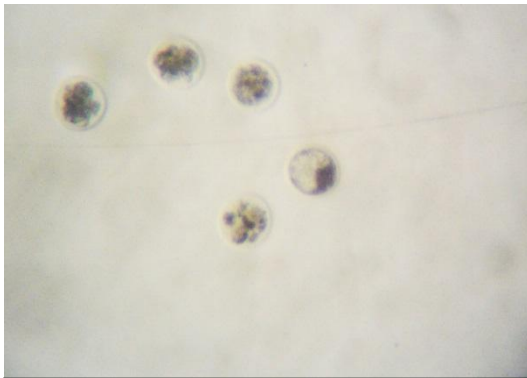




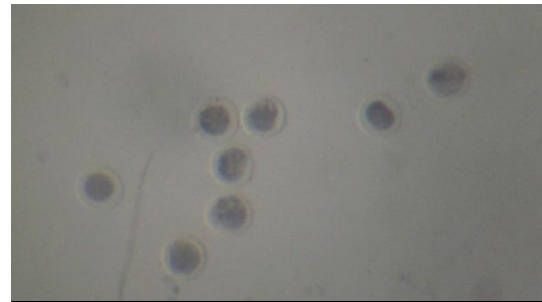
Embriones de Enriqueta: segunda prueba.



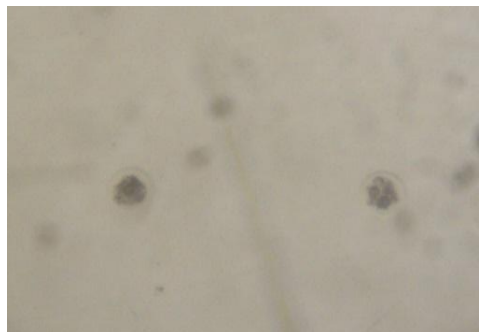
Embriones de Kika: segunda prueba.



Embriones de Bárbara: primera prueba.



Embriones de Preciosa: segunda prueba.



Embriones de Bárbara: segunda prueba.



Proceso de criogenización.

Fuente: Carlos Arévalo 2013.
Figura 17. Embriones obtenidos en la investigación.

4.5. COSTOS DE EMBRIÓN CONGELADO Y FRESCO

Una vez recolectada toda la información sobre los resultados de la producción de embriones se procedió a establecer los costos de producción de los mismos en nuestra Región Amazónica Sur, basados en la aplicación de los dos tratamientos, los mismos que fueron establecidos a diciembre del 2013 en dólares norteamericanos:

Cuadro 13. Costos de producción de embriones para ganado Charolaise aplicando los dos tratamientos.

Raza	Protocolo	Rubro de gasto (promedio donadora)		# Embriones viables promedio/donadora	# Embriones congelables promedio donadora
		Rubro	Costo		
Charolaisee	T1	Insumos para embriones	576	2,5	1,5
		Alquiler de equipos para embriones	300		
		Hormonas para el tratamiento	531		
		Dosis de Semen congelado	110		
		Jornales y movilización	71		
Total costos embrión en fresco			1350	540	
Total costos embrión congelado			1588		1058,67
Charolaisee	T2	Insumos para embriones	576	6	5
		Alquiler de equipos para embriones	300		
		Hormonas para el tratamiento	494		
		Dosis de Semen congelado	170		
		Jornales y movilización	105,6		
Total costos embrión en fresco			1319,6	219,93	
Total costos embrión congelado			1645,6		329,12

Fuente: Investigación de campo 2013.

Elaborado por: Carlos Arévalo S.

En cuanto a los costos de producción analizados en la raza Charolaise, el menor costo resultó el tratamiento dos con un valor de \$219,93 embrión en

fresco y \$329,12 embrión congelado, considerando para ello solo los de grado uno. Para el tratamiento uno en esta raza los costos se encarecen por la cantidad de embriones recuperados y la poca respuesta con este tratamiento, para ello se tiene que el costo del embrión en fresco llego a ser de \$540 en fresco y congelados \$1058,67.

Cuadro 14. Costos de producción de embriones para ganado Brown swiss aplicando los dos tratamientos.

Raza	Protocolo	Rubro de gasto (promedio donadora)		# Embriones viables promedio/donadora	# Embriones congelables promedio donadora
		Rubro	Costo		
Brown swiss	T1	Insumos para embriones	576	1,5	1
		Alquiler de equipos para embriones	300		
		Hormonas para el tratamiento	486		
		Dosis de Semen congelado	110		
		Jornales y movilización	71		
Total costos embrión en fresco			1305	870	
Total costos embrión congelado			1543		1543
Brown swiss	T2	Insumos para embriones	576	3	2,5
		Alquiler de equipos para embriones	300		
		Hormonas para el tratamiento	494		
		Dosis de Semen congelado	170		
		Jornales y movilización	105,6		
Total costos embrión en fresco			1319,6	439,87	
Total costos embrión congelado			1645,6		658,24

Fuente: Investigación de campo 2013.

Elaborado por: Carlos Arévalo.

El análisis del costo de producción más bajos de los embriones fueron para el tratamiento dos (T2) con un valor de \$439.87 en promedio para embrión en fresco y congelados de \$658.24. En el tratamiento uno(T1) resulto demasiado

costoso por la cantidad de embriones obtenidos, por ello tenemos que para los embriones en fresco resulto tener un valor de \$870 y congelados de \$1543 en promedio.

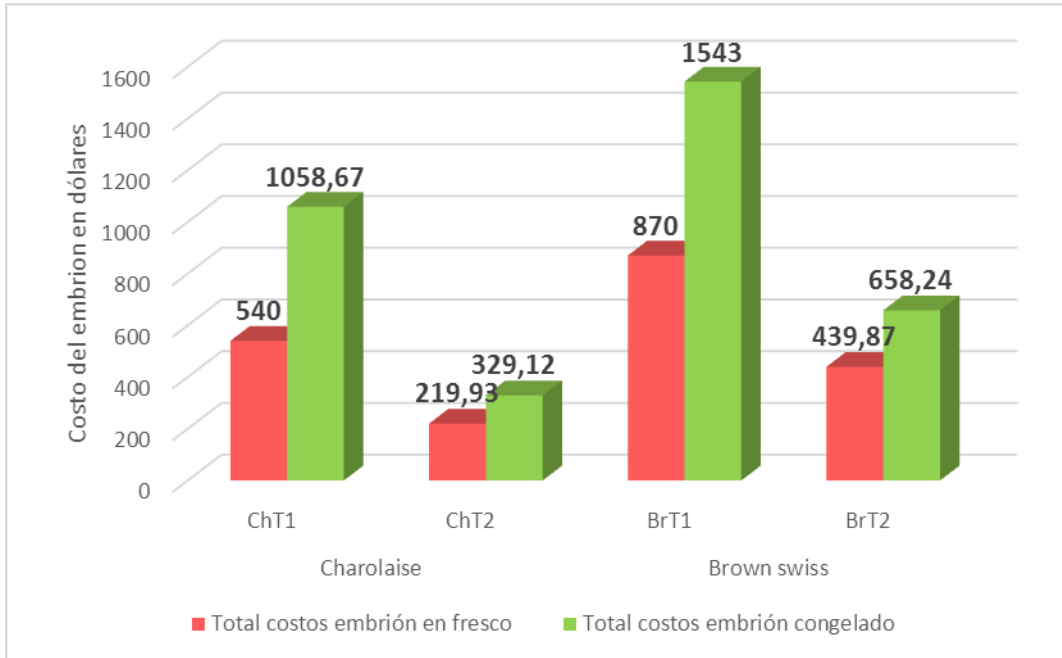


Figura 18. Análisis de costos de producción de embriones en fresco y congelados.
Fuente: Investigación de campo 2013.

Establecidos los costos de producción de embriones bajo estos dos parámetros de investigación se aprecia en el grafico 5, que los costos de producción de embriones resulta ser el más bajo para el tratamiento dos tanto en Charolaise como en Brown Swiss, frente al tratamiento uno que resultaron en nuestra experiencia con costos más elevados tanto para embriones en frescos como congelados.

5. DISCUSIÓN.

5.1. NUMERO DE ESTRUCTURAS (FOLÍCULOS Y CUERPOS LÚTEOS) PRESENTES EN LOS OVARIOS.

La presencia de cuerpos lúteos en nuestra investigación es importante para establecer el promedio de embriones que se puede recuperar y la reacción de la hembra donante a los tratamientos de superovulación, según esto los mejores resultados de presencia de cuerpos lúteos fue el tratamiento dos (T2). Para Beal, W.B. (1999), la técnica del ultrasonido en donadoras para determinar estructuras es una metodología de uso para establecer exactitud en el diagnóstico y pronóstico de la hembra donadora.

Las diferencias en resultados entre razas y tratamientos fue claramente notable para las hembras Charolaise en relación a la Raza Brown Swiss, para R.P. Elsdén et al. (1985) ha reportado que hay gran variación de las respuestas de Follitropin V® (Bioniche, Canada) en vacas que han recibido la misma dosis. Algunos animales son sensibles a los efectos de la hormona, otras son sensibles temporalmente y otras son exageradamente sensibles produciendo un crecimiento exagerado de los ovarios como una naranja dificultando la recuperación de los embriones por fallas mecánicas. Por ello la importancia de tener un diagnóstico certero sobre el tamaño y cantidad de cuerpos lúteos en el ovario.

De acuerdo con Stevenson et al. 2000, un tratamiento de sincronización estral es mejor cuando posterior a su aplicación, permite la formación de cuerpos lúteos, por ello la importancia previo al lavado de embriones en nuestra investigación de analizar la respuesta mediante ecografía o palpación para determinar las estructuras que nos ayudaran a predecir la respuesta de las donadoras frente a un SOP, los resultados mejores se observó en el tratamiento 2 y específicamente la donadora que mejor respuesta tuvo en los dos tratamientos fue la hembra Charolaise dos.

En esta investigación en cuanto a estructuras ováricas se obtuvo una presencia considerable de folículos no ovulatorios (FNO) teniendo así que la mayor cantidad de folículos no ovulatorios se tuvo en el tratamiento uno (protocolo convencional con estrógenos) un promedio de 4 por donante y específicamente se tuvo la presencia de 11 FNO en el tratamiento uno con ganado Browns swiss específicamente de la donante cartoon Barbara, se atribuye muy posiblemente a los niveles elevados de FSH presentes en la hipófisis y en los ovarios durante la ovulación (Kanitz et al., 2002, mencionado por Quito Juan., 2013.), comparado con el tratamiento T2 en el cual el promedio de FNO fue en baja cantidad teniendo promedios de 0,75 en promedio.

5.2. NÚMERO DE EMBRIONES RECOLECTADOS.

La P4 actúa en el útero estimulando y manteniendo las funciones necesarias para el desarrollo embrionario temprano, esto con la finalidad de llevar a cabo la implantación, placentación y desarrollo fetal. De acuerdo a esto se ha afirmado que la síntesis de proteínas uterinas durante el desarrollo embrionario temprano está influenciada principalmente por la acción de la P4, la cual es la responsable de los cambios cualitativos y cuantitativos en el medio ambiente uterino, controlando la síntesis y secreción de por lo menos 10 proteínas (Spencer et al, 2004). Por ello sostenemos que la respuesta de las donantes al tratamiento 2, fue mucho mejor que el tratamiento 1, por obtener más P4 a nivel del útero y de la sangre del animal por un periodo prolongado por ello las respuestas de más embriones como lo demuestra los promedios de T2 con producción de 7,25 embriones por donante en relación al T1 que resulto con 2.75 embriones por donante.

Para Nasser et al, (1993); Adams, (1994), indican que la superovulación en la primera onda de desarrollo folicular se puede realizar con resultados comparables a las realizadas en otras ondas de desarrollo folicular. Pero en

nuestro caso los resultados de inducir la SOP sin la utilización de estrógenos nos ha dado mejores resultados desde el punto de vista matemático estableciendo rangos favorables en la respuesta de las dos razas, teniendo un comportamiento diferente tanto para hembras de carne como para hembras de leche.

Según Daniel Carballo (2012) se observó una diferencia numérica a favor del grupo de tratamiento en que no se removió el dispositivo intravaginal. Esto se puede deber a que probablemente en este grupo la superestimulación se realizó con niveles de P4 generales más bajos, ya que al no removerse dicho dispositivo, alguna parte de la P4 del mismo (aproximadamente el 50%) ya se ha absorbido al inicio de la superestimulación, en nuestro caso la respuesta que se observó tanto en estructuras como en embriones recuperados fueron de la mano por el efecto o beneficios que proporciona la progesterona por más tiempo en los protocolos para donantes.

La realización de tratamientos superovulatorios en donantes en las que se les colocaron dispositivos o implantes pero no se les administro estrógenos simultáneamente han tenido resultados discordantes. En algunos trabajos han afectado las tasas de fecundación (Bó y col., 1996b) y de recolección (García Winder y col., 1988): adjudicándose estos hechos a desbalances endocrinos que pueden haber afectado el transporte de los gametos y los embriones. En otros trabajos la respuesta superovulatoria no ha sido afectada (Wu y col., 1988b; Yaaakub y col 1998). En la realización de esta investigación tenemos numérica y estadísticamente una diferencia a favor del T2 (sin el uso de estradiol), con una mayor respuesta ovulatoria y presencia de embriones obtenidos.

Los resultados obtenidos de programas de superestimulación tanto experimentales como comerciales (Bo et al., 2002) han demostrado que la respuesta superovulatorias de donantes tratadas con protocolos convencionales de CIDR mas estrógenos es comparable con la respuesta de

donantes tratadas con el protocolo tradicional. En nuestro caso los resultados con el protocolo convencional nos dieron como resultados 2,75 embriones de promedio en relación a la variante del T2 con 7,25 embriones de promedio.

La cantidad de embriones recuperados Según el trabajo de Elsden et al. 1989, que manifiestan de que de cada animal se debería recuperar 6 embriones, Pero en nuestro caso en el tratamiento uno fue muy baja con un promedio de 2,75 embriones comparada con el tratamiento dos con 7,25 embriones por donante, por ello la pobre respuesta del tratamiento uno según Lindsell et al., 1986, puede deberse al momento de la aplicación del tratamiento con relación al ciclo estral y/o a la presencia de folículos persistentes, los cuales puede producir estrogenización del útero y presencia de abundante secreción mucosa que dificulta el proceso de lavado y colecta de embriones.

5.2.1. Calidad de Embriones Recolectados.

Al no haber encontrado información de parámetros detallados sobre la calidad de embriones tanto en raza como de tratamientos sobre este tema ise define que el tratamiento dos (T2) fue el que mayor respuesta se obtuvo en nuestra investigación en cuanto a la calidad de embriones y las mórulas y blastocistos de mejor calidad se obtiene aplicando el tratamiento dos. Al analizar por raza se define a la raza charolaise como la que mejor respuesta dio al tratamiento dos.

5.3. NUMERO DE MÓRULAS Y BLASTOCITOS (CALIDAD 1) PARA CRIOCONGELACIÓN.

Al no existir información sobre la calidad de mórulas y blastocistos como resultados de investigaciones sobre este tema, enunciaremos que el mayor número de mórulas grado uno nos ha producido el T2 con un valor medio de 3,35 en promedio, comparado con el T1 que nos da una mórula en promedio,

blastocistos grado uno tenemos solamente en pequeñas cantidades como son en los tratamientos y animales en ChT2, BrT1 y BrT2.

5.4. COSTO DE EMBRIÓN CONGELADO Y EN FRESCO.

No existiendo datos relacionados a los costos de producción comparables con esta investigación establecemos que, los costos de producción en promedio por raza y tratamientos tenemos que el tratamiento T2 de las hembras Charolaise fue el más bajo con un total de \$ 219,93 en fresco y \$ 329,12 congelado (costo establecido en el mes de Octubre del 2013).

6. CONCLUSIONES

La presente investigación tiene por efecto evaluar comparativamente el uso de estrógenos en los protocolos de sincronización de donantes de embriones bovinas tanto de leche como de carne para lo cual se puede concluir que si es posible eliminar los estrógenos de los protocolos de sincronización en nuestra región, dado que la diferencia estadística entre los dos tratamientos es significativa en la respuesta ovárica en el tratamiento T2, con una mayor presencia de cuerpos lúteos y menor número de folículos anovulatorios, siendo mejor que el tratamiento convencional CIDR 8 días más estrógenos (T1).

Al determinar la cantidad de embriones obtenidos en cada uno de los tratamientos si es posible trabajar en los protocolos sin estrógenos ya que los mejores resultados obtenidos de embriones producidos para las dos razas, dado que fue T2 mejor que el T1 y para el caso de las razas diremos que la mejor respuesta fue para las hembras Charolaisee que para las Brown Swiss, posiblemente debido a que el ganado tipo leche (Brown Swiss) metaboliza a nivel del hígado más rápidamente las sustancias hormonales que el bovino de carne (Charolaise).

En la calidad de los embriones, los mejores resultados se obtuvo en el tratamiento dos (T2 CIDR 12 días sin estrógenos) que el tratamiento uno (T1 CIDR 8 días con estrógenos), definiendo que la mejor respuesta fue en la raza Charolaise que en la Brown Swiss y la mayor cantidad de embriones de calidad uno tanto mórulas como blastocistos analizados fue para el T2 concluyendo que si es posible aplicar protocolos sin estrógenos en nuestra región con buenas respuestas en cuanto a calidad de embriones obtenidos.

La crioconservación se realizó solo a las mórulas calidad uno y blastocistos calidad uno para lo cual se estableció que el tratamiento T2 fue quien más embriones criocongelados produjo en relación al tratamiento T1; en cuanto al factor raza, la Charolaise presentó las mejores respuestas en cuanto a embriones criogenizados que las donantes Brown Swiss, concluyendo que con

la aplicación de protocolos sin estrógenos es posible obtener una cantidad de embriones superior a los promedios nacionales de producción para congelación.

Analizando los costos de la investigación se concluye que el T2 es el que más bajos costos resulto para la producción de embriones y la raza que más bajos costos presento fue las hembras Charolaise que las Brown Swiss, determinando con esto que la aplicación de protocolos sin estrógenos pueden traernos ventajas económicas en cuanto a la producción de embriones in vivo en la Región Sur Amazónica.

7. RECOMENDACIONES

- Previo a la realización de un lavado de embriones realizar una ecografía para conocer el tipo de estructuras que existen a nivel de los ovarios.
- Se recomienda realizar la superovulación utilizando el tratamiento dos CIDR 12 días sin estrógenos por los resultados favorables que nos dio en la región amazónica tanto en hembras de carne como de leche.
- Al detectar la presencia de folículos anovulatorios, es recomendable no realizar el lavado de embriones en las donantes que presenta estas estructuras ováricas, pues ello provoca estrogenización del útero, mayor irrigación y por ello más predisposición a obtener sangre en la colecta, sumado a ello la mayor presencia de moco, lo que dificulta el proceso de colecta (taponamiento de catéter Foley y/o filtro) y para la búsqueda y captura de las estructuras embrionarias.
- Realizar más investigación sobre el tema de la eliminación de los estrógenos por cuanto en países desarrollados como los Estados Unidos y parte de Europa está prohibido su uso por los efectos residuales sobre la salud humana.
- Para el proceso de producción de embriones hay que tratar de reducir los costos de producción dado que por el momento resultan bastante costoso y de difícil acceso para pequeñas ganaderías en nuestra región.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdul Saeed S., Hutchinson J., Broadbent P., and D. Dolman., (1989). Hormonal profiles in superovulated Hereford x British Friesian Heifers Theriogenology 31, 253.

Adams GP (1994). Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superovulation Theriogenology 41, 19-24.

Adams G.P., Nasser L.F., Bo G.A., Garcia A., Del Campo, M.R. and Maplettoft, R.J., (1994). Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. Theriogenology 42, 1103-1113.

AETE (1991; 1992; 1993; 1994; 1995; 1996; 1997; 1998; 1999; 2000). Proceedings of the Scientific Meetings of the European Association of Embryo Transfer.

Alcivar A., Maurer R., and L. Anderson., (1984). Superovulatory responses in FSH - or Pergonal- treated heifers Theriogenology 22, 635 – 641.

Anderson L.H., Day M.L., (1994). Acute progesterone administration regresses persistent dominant follicles and improves fertility of cattle in which estrus was synchronized with melengestrol. J Anim Sci, 72: 2955-2961.

Baruselli P.S., SáFhilo M., Matins C.M., Naser L.F., Nogueira M.F.G., Barros C.M., and Bó G.A., (2006). Superovulation and embryo transfer in BosIndicus cattle. Theriogenology 65,77-88.

Beal W.B., (1999). Practical application of ultrasound in bovine embryo transfer. 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA, pp. 66-77.

Becaluba, F., (2007). Factores que afectan la superovulación en bovinos (en línea). Consultado el 15 de Diciembre del 2013. Disponible en: [http://www.engormix.com/factores afectan superovulacion bovinos articulos 1684 GDC.htm](http://www.engormix.com/factores%20afectan%20superovulacion%20bovinos%20articulos%201684%20GDC.htm)

Bergfelt D.R., Bó G.A., Mapletoft R.J., and Adams, G.P.,(1997). Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 49, 1-12.

Bergfelt D.R., Lightfoot K.C., and Adams G.P., (1994). Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 42, 895-907.

Bielanski A.; Yadav., (1990). A note on fertilization and embryo production in superovulated cattle with various levels of subcutaneous fat tissue. *Animal Production* 51: 426 – 430.

Bó G.A, Baruselli P.S, Moreno D., (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57: 53-72.

Bó G.A., D.R Bergfelt and R.J. Mapletoft., (1996). Follicle wave dynamics and superovulation in cattle: Recent advances and practical experience *ArqFacVet UFRGS* 24, 31-52.

Bó G.A., Adams G.P., Caccia M., Martinez M., Pierson 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.

Bó G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez M., Pierson 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.

Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., and Mapletoft R.J., (1996). Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 45, 897-910.

Bó G.A., Adams, G.P., Pierson R.A., Caccia M., Tribulo H., and Mapletoft R.J., (1994b). Follicular wave dynamics after estradiol 17- β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41, 1555-1569.

- Bó G.A., Hockley D.K., Nasser L.F., and Mapletoft R.J., (1994a). Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology* 42, 963-975.
- 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.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tríbulo R., Tríbulo H., and Mapletoft R.J., (2002a). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57, 53-72.
- Bó G.A., and Caccia M., (2002b.). Dinámica folicular en el bovino. En: reproducción en los animales domésticos, Tomo I. R. Ungerfeld. Montevideo, Uruguay. pp. 55-68.
- Bó G.A., Chesta P.M., Carballo Guerrero D., Mapletoft R.J., (2007). Nuevas alternativas para la superovulación de donantes de embriones. VII Simposio internacional de reproducción animal, Córdoba, Argentina, pp.183-198.
- Bó G.A., Daniel Carballo Guerrero, Andrés Tríbulo, Humberto Tríbulo, Ricardo Tríbulo, Reuben J. Mapletoft., (2009). VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal IRAC, Zona Rural General Paz, (5145) Córdoba, Argentina.
- Bó G.A. Carballo Guerrero, D. and Adams G.P., (2008). Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 69, 81-87.
- Bó G.A., Mapletoft R., Tribulo H., (2010). Transferencia de embriones y nuevas tecnologías. Universidad Nacional de Cordoba. Facultad de ciencias agropecuarias; Cardoba, Argentina.
- Booth W., Newcomb R., Strange H., Rowson L. and H. Sacher, (1975). Plasma and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. *vet rec* 97, 366 – 369.

Bungarts L., and Niemann H., (1994). Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fertil.* 101, 583-591.

CLADEAD (Centro Latinoamericano de Educacion a Distancia). Manual de Transferencia y criopreservación de embriones Bovinos., (2008). Uruguay.

Carballo G Daniel M., (2012). Superovulacion en la primera onda folicular, tesis de grado, Universidad Nacional de Cordoba, Córdoba, Argentina

Castro A., (2007). Condición corporal. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.

Castro A., (2007). Influencia en la raza en la aspiración de oocitos. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.

Colazo M.G., Ambrose D.J., and Mapletoft R.J., (2007b). Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with pLH or GnRH. *J Dairy Sci*, 90, 328 (abstract).

Colazo M.G., Kastelic J.P., Small J.A., Wilde R.E., Ward D.R., and Mapletoft R.J., (2007a). Ovarian follicular dynamics, CL function, estrus, ovulation, and fertility in beef cattle resynchronized with progestins and ECP, GnRH or progesterone. *Can Vet J.* 48, 49-56.

Crister JK, Rowe RF, Del Campo MR, Ginter OJ., (1980). Embryo transfer in cattle: Factors affecting superovulatory response, number of transferable embryos and length of post treatment estrus cycle. *Theriogenology* 13:397 p406.

Critser E. Critser J Winch R. and C. Eilts., (1982) Efficacy of Pergonal as a superovulatory drug in cattle *Theriogenology* 17, 83.

Crowe M.A., Enright W.J., Boland M.P., Roche J.F., (1993). Follicular growth and serum FSH responses to recombinant bovine FSH (rbFSH) in GnRH immunized heifers. *J Anim Sci.* 71: 212 (abstract).

Deyo C.D., Colazo M.G., Martinez M.F., and Mapletoft R.J., (2001). The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. *Theriogenology* 55, 513 (abstract).

Díaz N., (2007). Dinámica folicular en la hembra bovina. Mecanismos de las ondas foliculares. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.

Donaldson L., (1984). Dose of FSH-P as a Source of variation in embryo production from superovulated cows *Theriogenology* 22, 205 – 212.

Donaldson L. and D. Ward., (1985). Superovulation in cattle: Dose – response to FSH-p with and without LH contamination *Theriogenology* 23: 189.

Döcke, F., (1981). Veterinar medizinsche Endokrinologie, 2. Auflage. Verlag, Jena.,

Döcke F., (1984). Zur Bedeutung des Gn-RH für die Regulation des Ovarialzyklus. *Vet. Med.* 39 - 150.

D'Occhio M.J., Sudha G., Jillella D., Write T., MacLellan L.J., Walsh J., Trigg T.E., Miller D. 1997. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. *Theriogenology*, 47:601-613.

Ginter OJ, Knopf Lkastelic JP., (1989). Temporal Association among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two or three follicular waves. *J.Reprod.Fertil.* 87:223-230.

Ginter OJ., (1995). Follicular Dynamics in Heifers and Mares. *Relaciones embriomaternas y Biotecnologías reproductivas.* Univ. Austral de Chile, pag.21.

Ginther, O.J., Kastelic, J.P, and Knopf, L., (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. *J. ReprodFertil.* 87, 223-230.

Görlach, A. 1997. Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Ed. Acriba, S.A. Zaragoza, España. 130 p.

Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de San Juan Bosco (GADMSJB)., (2011). Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial cantonal. Morona Santiago- Ecuador.

Godke R. Bercovitz, A and J Kreider., (1978). A technique for continuous infusión of donor heifers with FSH Therionenology 9,93.

Gong J.G., Campbell B.K., Bramley T.A., Gutierrez C.G., Peters A.R., Webb R., (1996). Suppression in the secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin releasing hormone agonist. Biol Reprod. 55: 68-74.

Gordon, I., (1996). Reproduction in Cattle & Buffaloes. Volume 4. Ed. CAB International. Wallingford, UK. 492 p.

Gordon, I., (2004). Tecnología de la reproducción de animales de granja. Ed. Acibia S.A. Zaragoza, España. 441 p.

Grasso F, Guibault LA, Roy GL and JG Lussier., (1989). Ultrasonographic determination of ovarian follicular deelopment in superovulated heifers pretreated with FSH-p at the beginning of the estrous cycle Theriogenology 31, 1209-1220.

Guibault L.A., Grasso F.J., G. Lussier, Matton P. and P. Rouillier., (1991). Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in presence of a dominant follicle J ReprodFertil 91, 81-89.

Gustavo Palma., (2008). Biotecnología Reproductiva, segunda edición. Ediciones plugliese Sierna sarachago 122-B AñltaCordoba – Argentina.

Hasler J.F., (1992). Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle J Dairy Sci, 75, 2857-2879.

Hasler J.F., (2000). Comparation between conventional in vivo and in vitro production of embryos in bovine embryo transfer programs Cong ArgReprodAnim, Rosario, Argentina, 14-15 September.

Hill, B.R, and Kuehner, L.F. (1996).Follicle aspiration prior to superovulation in cattle.Theriogenology 43, 324. (abstract).

Hincapié, J.; Capallejas, R.; Pipaon, E., (2003). Reproducción animal aplicada: Fundamentos de fisiología y biotecnología. Ed. Litocom. Tegucigalpa, Honduras. 233 p.

Huhtinen M., Raino V., Aalto J. and P. Bredbacka., (1992). Increased ovarian responses in the absence of the dominant follicle in superovulated cows Theriogenology 37, 457-463.

Illera, M., (1994). Reproducción de los animales domésticos. Ed. AEDOS. Madrid, España. 390 p.

Kim, H.I., Son, D.S., Yeon, H., Choi, S.H., Park, S.B., Ryu, I.S., Suh, G.H., Lee, D.W., Lee, C.S., Lee, H.J., and Yoon, J.T., (2001). Effect of dominant follicle removal before superovulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. Theriogenology 55, 937-945.

Lane, E.A., Austin, E.J., and Crowe, M.A., (2008). Estrus synchronisation in cattle-Current 388 options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals: A review. Anim. Reprod. Sci. 109, 1-16.

Larocca, C., (1996). Transferencia de tecnología en trasplante de embriones en tambos medianos y pequeños. VI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Resúmenes en CD. Montevideo. Uruguay.

Larocca, C., Fernandez, A.; Lanza, R.; Roses G.; Armand Ugon, P.; Crispo, M.; Lago, I.; Kajihara, Y., (1998). Different superovulatory treatments in bovines with PMSG, Anti -PMSG. XIII reunión anual de la Sociedad Brasileira de Transferencia de Embriones. Atibaia. San Pablo. Brasil.

Lauria A., Genazzani A., Oliva O., Inaudi P., Cremonesi F., Monittola C. and G. Aureli, (1982) Clinical and endocrinal investigation on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin J Reprod Fer 66, 219 – 225.

Lerner S.P., Thayane W.E., Baker R.D., Hensche T., Meredith S., Inskip E.K. Dailey R., Lewis P.E, Butcher R.L., (1986) .Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. J. Anim. Sci., 63:176-183,

Lindsell, C.E., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J., (1986). Superovulatory endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26, 209-219.

Looney C., Boutte B., Archpald L. and R. Godke, (1981) Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle *Theriogenology* 15, 13 – 22.

Macmillan, K.L. and Thatcher, W.W., (1991). Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 45, 883-889.

Mc Gowan M., Johnson W., Mapletoft R. and W. Jochle, (1983). Superovulation of beef heifers with pergonal (HMG): A dose response trial *Theriogenology* 19, 141.

Manual of the International Embryo Transfer Society, 3rd edition, (1998).

Mapletoft RJ, Pawlyshyn V, Garcia A, Bo GA, 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 R.J., Pierson R.A., (1995). Factors Affecting Superovulation in The Cow: Practical Consideration. *Relaciones Embrio-Maternas y Biotecnologías Reproductivas*. Universidad Austral de Chile. Chile.

Mapletoft, R.J. and Pierson R.A., (1993). Factors affecting superovulation in the cows: practical considerations. *IETS Embryo Transfer Newsletter*, 11: 14-24.

Mapletoft, R. Gonzalez A. and J. Lussier, (1988). Superovulation of beef heifers with Follitropin or FSH – p *Theriogenology* 29, 274.

Mapletoft, R.J., Bó, G.A., and Adams, G.P. (2000). Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, 28 pp. 23-48.

Martinez M.F., Adams G.P., Bergfelt D., Kastelic J.P., and Mapletoft R.J., (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant Follicle of the first follicular wave in weifers. *Anim. Reprod. Sci.* 57, 23-33.

Moreno, J.,(2004). Transferencia de embriones en bovinos. Texas, EUA. 97p.

Monniaux D., Chupin D. and J. Saumande, (1983). Superovulatory responses of cattle *Theriogenology* 19, 55 – 81.

Mc Gowan M., Braithwaite M., Jochle W. and R. Mapletoft, (1985). Superovulation of beef heifers with pergonal (HMG): A dose response trial *Theriogenology* 19,141.

Nasser L.F., Adams G.P., Bo G.A. and R.J. Mappetoft, (1993). Ovarian superestimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers *Theriogenology* 40, 713-724.

Nasser LF, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS. 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors.*Theriogenology*. 76(2): 320-327.

Newcomb R., (1980). Investigation on factors affecting superovulation and non surgical embryo recovery from lactation british Friesian cows *Vet Rec* 106, 48 – 52.

Orellana J.C., Peralta M.E., (2007). Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Tegucigalpa Honduras

Palma G.A., Wennigerkind H., Mödl J. and G. Brem, (1995). The application of biotechnology in cattlereproduction, the situation today and future applications *Rev Arg Prod Anim*, 159-165.

Palma, G.; Brem, G., (1993). Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 503 p.

Papkoff H., (1981). Variations in the propeties of equine chorionic gonadotrophin *Theriogenology* 37, 272.

Pawlyshyn V. Lindsell C. Braitwaite M. and R. Mapletoft, (1986). Superovulation of beef cows with FSH-p: A dose response trial *Theriogenology* 25, 179.

Pursley, J.R., Mee, M.O., and Wiltbank, M.C., (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology* 44, 915-923.

Putney, D.; Drost, M.; Tatcher, W., (1988). Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 pos insemination. *Theriogenology* 30: 195-209.

Prendiville D.J., Enright W.J., Crowe M.A., Finnerty M., Roche J.F., (1995). Immunization of heifers against gonadotropin-releasing hormone, antibody titers, ovarian function, body growth, and carcass characteristics. *L Anim Sci*, 73: 2382-2389.

Ramakrishna O. and Ramachandraiah S., (1989). Repeated superovulation in crossbred cows *Indian Anim Sci* 59, 94 – 96.

R.P Elsdén y G.E Saidel, Jr., (1985) Procedimientos para recolección, División, congelación y transferencia de embriones bovinos, laboratorio de reproducción animal, boletín N° 2, Colorado State University 42pp., 1985.

Robertson, E. 2002. *Non-Surgical Embryo Transfer*. 8th Edition. Harrogate Genetics International, Inc. Tennessee, USA. 33 p.

Rodríguez, C.F.M., (1988). Qualitative and quantitative evaluation of embryo transfer in cattle. I. Performance of zebu and *Bos taurus* cattle. *Revista del Centro de Ciencias Rurales* 18 (suppl.), 373.

Quito Aldaz Juan Carlos, (2013). Respuesta a la superovulación en vacas criollas enceradas utilizando dosis reducidas de fsh. Tesis de Grado, Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador.

Saumande J. and D. Chaupin, (1981). Production of PMSG antiserum in cattle: Assay of inhibitory activity and use in superovulated heifers *Theriogenology* 15, 108.

Saumande J. and D. Chaupin, (1986). Induction of superovulation in cyclic heifers: the inhibitory effect of large doses of PMSG in superovulatory treatment in cattle *Theriogenology* 27, 274.

Savio J.D., Thatcher W.W., Morris G.R., Entwistle K., Drost M. and Mattiacci M.R., (1993). Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 98: 77-84.

Small J.A., Colazo M.G., Kastelic J.P., Mapletoft R.J., (2009). Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology*, 71: 698-706.

Storring P., Dixon H., and D., Bangham, (1976). The first international standard for human urinary FSH And for human urinary LH (ICSH) for bioassay *Acta endocrinol* 83, 700 – 710.

Stock A.E., Fortune J.E., (1993). Ovarian follicular dominance en cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, 132: 1108-1114. Sunderland S.J., Crowe M.A., Boland M.P., Roche J.F., Ireland J.J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*, 101: 547-555.

Tegegne A. Franceschini R. and S. Sovani (1994) Superovulatory response, embryo recovery and progesterone secretion in Boran (*Bos Indicus*) cows after treatment with either Pergovet or pluset *Theriogenology* 51, 1151 – 1156.

Thibault, C., (1977). Are Follicular Maturation and Oocyte maturation independent processes. *J. Reprod. Fert.* 51 - 1.

Thibier M., (2000). The IETS statistics of the embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine in vivo-derived embryos transferred A data retrieval committee report *Embryo Transfer Newsletter*, 24-28.

Wang H. Wu M. Patt D. Murphy B. and R. Mapletoft, (1988). Superovulation in beef heifers with PMSG: Effect of dose and monoclonal antibodies to PMSG *Theriogenology* 29, 323.

Wock J.M., Lyle L.M., and Hockett M.E., (2008). Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17 β at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 228 (abstract).

Zeitoun M. Yassen A. Hassan A. Fathelbab A. Wise T. and R. Maurer, (1988). Superovulation using PMSG an anti – PMSG in beef cows *Theriogenology* 29, 339.

Consultas en internet:

http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/30-mantenimiento_del_termo.htm

http://www.shangko.com/product/cd-jf/product_Storage.html

9. ANEXOS

ANEXO 1. REGISTRÓ DE DONANTES CHAROLAISE.



REGISTRO GENEALÓGICO DE BOVINOS CHAROLAIS

CERTIFICADO

DE INSCRIPCIÓN A LIBRO ABIERTO DE LA VACA

REGISTRO ASOCHMS: 0044 - J1

F. NACIMIENTO: 14 - Feb. - 2007

NOMBRE: LI KIKA

TATUAJES: OD: LI 02/07 OI: LI 04

COLOR: BLANCO MUCOSAS ROSADAS

PADRE: OBELIX REG. No: 398109489

MADRE: LI TIGRESA 04 REG.ASOCHMS: 0283 - 1

CRIADOR: HERNAN VASQUEZ

PROPIETARIO: HERNAN VASQUEZ

PREDIO ACTUAL: LA LIBERTAD HIERRO: LI

Previo a la elaboración de este certificado, personal técnico calificado ha inspeccionado y marcado con tatuaje el ejemplar, del mismo que su fenotipo y genealogía han sido aceptados para ser inscrito en los libros de registros genealógicos, respetando los estatutos y reglamentos de la ASOCIACIÓN CHAROLAIS DE MORONA SANTIAGO.

República del Ecuador - ciudad de Macas, 7 de diciembre del 2010

BOSCO ZABALA
PRESIDENTE

ING. GUSTAVO VALVERDE M.
ASESOR TÉCNICO





REGISTRO GENEALÓGICO DE BOVINOS CHAROLAIS

CERTIFICADO

DE INSCRIPCIÓN A LIBRO ABIERTO DE LA VACA

REGISTRO ASOCH.M.S: 0465 - J

FECHA DE INSPECCION: 02 JUNIO 2012

NOMBRE: HVOB

TATUAJES: OD: HV 08/08 OI:—

COLOR: BLANCO MUCOSAS ROSADAS

PADRE: — REGISTRO: —

MADRE: — REGISTRO: —

CRIADOR: HERNÁN VASQUEZ

PROPIETARIO: HERNÁN VASQUEZ


PREDIO ACTUAL: LA LIBERTAD


HIERRO:

HV

Previa a la elaboración de este certificado, personal técnico calificado ha inspeccionado y marcado con tatuaje el ejemplar, del mismo que su fenotipo y genealogía han sido aceptados para ser inscrito en los libros de registros genealógicos, respetando los estatutos y reglamentos de la ASOCIACIÓN CHAROLAIS DE MORONA SANTIAGO.

República del Ecuador - ciudad de Macas, 6 de febrero del 2012


DR. EDWIN LOZADA B.
PRESIDENTE


ING. CLEMENT PERROQUIN
ASESOR TÉCNICO


Asociación
Charolais
de Morona Santiago

ANEXO 2. REGISTRO DE DONANTES BROWN SWISS.

REGISTRO INDIVIDUAL DE GANADO FINCA "EL SANTO".

Registro: 002

Nombre: ACE BARBARA

Fecha de Nacimiento: 15 Julio del 2010

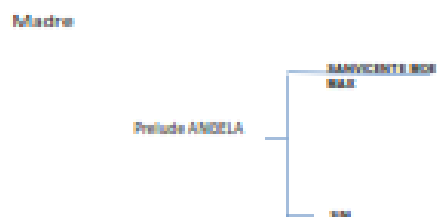
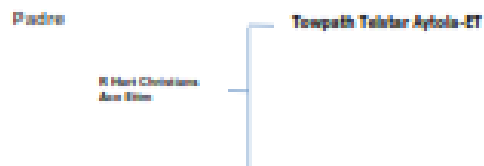
Tatuaje: 01 10014 00 J 04 Color: Café clara.

Aretic: 078913

Criador: Ignacio Campoverde

Propietario: Ignacio Campoverde

PEDIGREI:



Fecha de celo	Fecha de inseminación	Registro del toro.	Responsable

REGISTRO INDIVIDUAL DE GANADO FINCA "EL SANTO".

Registro: 003

Nombre: Cartoon Preciosa

Fecha de Nacimiento: 24 Octubre del 2011.

Tatuaje: O110014 OD J 04 Color: Café obscura

Areta: 078817

Criador: Ignacio Campoverde

Propietario: Ignacio Campoverde

PEDIUREI:

Padre



Madre



Fecha de celo	Fecha de inseminación	Registro del toro.	Responsable

ANEXO 3. TOROS SELECCIONADOS PARA LA INVESTIGACIÓN CON GANADO CHAROLAISE.



PRINCE Charolesa



Nombre: **PIET PRINCE**
 Código I.A.: **A-13-015**
 N° de Registro: **881289830**
 Fecha Nacimiento: **11/01/2009**
 Criador: **Raymond J&A Wilmart, Daxois**

Caracteres secundarios

Facilidad de parto	10
Fertilidad	Normal

PRINCE

Comentarios

- Hijo de MAJIC, campeón de París en 1999, Vahy 2796, Sirenia 1007, Le Masulo 1768 y campeón o campeón general de París en el año 2003.
- Por línea materna ascendente a EMPEROR, campeón en Vahy en 1992 y 1994, y segundo en París en 1996.
- Proceder de uno de los genitores. Inoculado más prestigioso de la raza charolesa.

ADIREKIN S.A.
 Centro de Inseminación
 Parque Tecnológico, Edificio nº 800
 49100 Daxois (Mayenne) - España
 Tel.: +34 94 854 25 77
 Fax: +34 94 854 26 79
 E-mail: comercial@adirekin.com

Evaluaciones genéticas

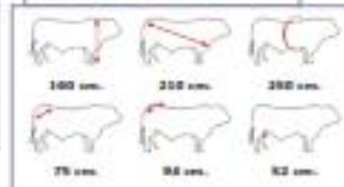
I. Crecimiento	110
D. Muesada	110
D. Espaldador	114
A. Potencial	112
C. Social	107
I. Resistencia	111

Genealogía

Datos zoométricos a los 03-05 años

Padre	
MAJIC - 8896107001	
Abuelo	
EMERSON - 7186112310	
Abuelo	
CHAR HILLS - 8897100030	
Peso	1138 kg.
Peso nacimiento	58 kg.
Peso 120 días	342 kg.
Peso 210 días	427 kg.
Peso 300 días	606 kg.
Resistencia media diaria	1758 gr.

Madre	
HENRIE - 8892120070	
Abuelo	
EMPEROR - 8895116120	
Abuelo	
PARADE - 8891000340	



RELAX



RELAX

HEC : F1712110322
 Qualification : RSE
 Ligne : A
 Naissur : EARL DES CARRAGES DU HAU
 Né le : 26/10/2000
 Père : JUMPOT
 Grand Père Maternel : DEL

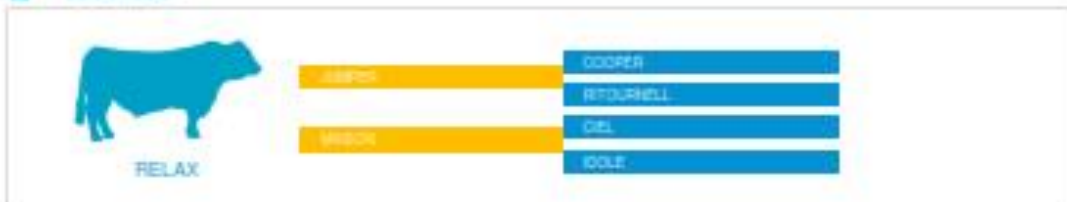
INDEX DE DESCENDANCE

Claw Descendance	DClaw Descendance Espérance	BEVR Valeur Al. Dactyle	AVel Apport à Père	IMAT Valeur Maternel
118	116	116	114	114

PERFORMANCE TAUREAU

		
1410 kg	162 cm	228 cm

généalogie





CHAROLAIS

Cedardale REBEL 3R

Sire: 55 Montana Silver
 LT Silver Value 2122
 LT Unlimited Maid

Dam: Baldridge Fasttrack 82F
 Cedardale Memorable 19M
 Cedardale Ms Juniper 12J



[Click here to View Video](#)



Born: 19/01/2005
Breeder: Cedardale Chamblais
Owner: Cedardale Chamblais
Weight:
Height: Frame 6.3
Scrotal: 35 cm

Tattoo: CED 3R
Reg. #: MC294731
BW: 92 lbs
AWW: 840 lbs
AYW: 1391 lbs
Stud code: 200CH0102

- Calving ease
- Growth
- Maternal
- Carcass

Dam: Cedardale Memorable 19M

CCA-S13

	ACC	EPD
CE	0.48	39
BW	0.71	1.3
WW	0.30	59
YW	0.36	101
MILK	0.17	17.2
TM	0.28	47
SC	FE	-0.10
CW	0.55	13
REA	0.54	0.04
FAT	0.55	0.57
LY	0.56	-0.81
MARB	0.48	0.03



ANEXO 4. TOROS SELECCIONADOS PARA LA INVESTIGACIÓN CON

01/2013

Dairy Bull - 014BS00288 - Triangle Acres PDayoff ETM



Wine-Meow Po Kagimara EX-91
Wine-Meow Swiss, Tillsboro, OH



2nd Lettalon Plankhof Korea



Mr Payoff Cerman



Plankhof KM

PAYOFF

014BS00288

Triangle Acres PDayoff ETM

Prelude x Collection x Patrick

Born: 2/2/1988

Reg No: BSUSA300000193627

sAs: 234 CMS: 126, 123

Breeder: Triangle Acres, Prewport, IL

Beta-casein: A2A2 - kappa-casein: BB



Triangle Acres PG-Payoff ET



- ▶ Calving Ease Specialist
- ▶ High CCR
- ▶ Tall Frames

Sire: Beta Vae Emory Prelude-ET EX-91
 Dam: Triangle Acres Coli Polly EX-93
 05-03 365d 2x40070m 4.7 1866f 3.5 1368p
 MGS: Pl Hank BC Collection TMEX-93
 MGD: Triangle Acres Polly EX-90 2E
 09-00 365d 2x40060m 3.7 1466f 3.3 1233p
 MGG: Tuolumne Patrick MEX-90
 MGGD: Triangle Acres Patk Poppy

USDA-CDCB MACE - BRE EVALUATIONS (12/2013)

Milk	+813	99%R	6472 Obs	3307 Herds	10% US
Fat	+13	-0.03%	23413e	4.0% 929	3.3% 770p
Protein	+25	+0.04%	EP1	7.5%	GM 7.2%
FL	-1.8	95%R	Net Merit \$		+89
SCS	2.34	99%R	Final Merit \$		+32
DFM	+0.1	95%R	Cheese Merit \$		+114
CCR	+1.2		CCR		+1.2

NAAB CALVING TRAITS EVALUATIONS (12/2013)

Sire Calving Ease	5.0%	97%R	1730 Obs
Daughter Calving Ease	4.2%	93%R	813 Obs
Sire Stillbirth	%	%R	0 Obs
Daughter Stillbirth	%	%R	NA Obs

USDA-CDCB/BSBA GENOMIC - TYPE (12/2013)

FMAT	+5.38	98%R	SDC-6.17	PLC-16.58	4274 Obs	2333 Herds	RRR +70
Stature							+1.30 Tall
Strength							+0.25 Strong
Dairy Form							+0.40 Open Rib
Rump Angle							+0.00 Sloped
Thurl Width							+0.39 Wide
Rear Legs Side View							-0.10 Pointy
Rear Legs Rear View							+0.20 Straight
Foot Angle							+0.40 Sleep
Mobility							+0.50 High
F. Udder Attachment							-0.40 Loose
Rear Udder Height							+0.40 High
Rear Udder Width							+0.20 Wide
Udder Cleft							-0.40 Weak
Udder Depth							-0.20 Deep
Front Test Placement							+0.20 Close
Test Length							+0.30 Long

GANADO BROWN SWISS.



**GENOMIC SEMEN
SIRE IN WAITING**

TANBARK™™

Wonderment x Premium x Jersey

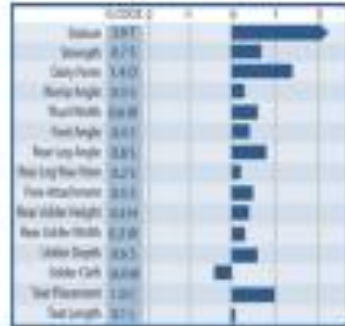
- The Breed's Best Choice for Your Next Winning Show Heifer!
- One of the Hottest Young Sires Ever and Available in Preferred Sexed Semen!
- Tall Dairy Frames, Style, Balance & Tremendous Feet & Legs!

5425485 Po-Cross Wonder TANBARK ET™™ + Reg 68122956 + CMS 128.561 + a/a 201422
Beta Casein: A2A2

12/13 G-CDCR PERFORMANCE			
MILK	FAT	PROTEIN	PPM
+1200	+44.7 -03%	+37.7 -03%	150
PRICE: 60#/B @ 275#/B -HDS TYPE: 67#/B			
PL -1.1	UDC +0.45	SCS 2.95	TYR -0.4
CE 4.9%	NMS 5180	DPR -0.4	MSB -0.2

MATING GUIDE	
+ Size & Dairyness	-Udder Cleft
+ Style & Open Rib	+ Fine Udder
Rear Legs: Some Set & Range Angle-Level	

Sire: Top Acres C Wonderment ET™™
G-UGDA 4-11 PTA +1333m +531 +.02% +30p -02%



Dam: Milk & Honey from Thury ET™™ E 92
USDA 4-11 PTA +547m +181 -02% +25p +.02%
2-03 305d 2x 16,430 4.0 PTD 3.4 894
4-02 305d 2x 20,850 4.1 1 888 3.5 725
Two-Time Nominated All-American



Full Sister: Po-Cross Wonder Tota
2011 Reserve All-American Jr. 2-Year-Old



Dam: Timberline Jersey from 3M™ J2 94
3-06 305d 2x 22,380 3.7 831 3.8 841
5-11 305d 2x 25,110 5.0 1,258 3.5 894
8-11 305d 2x 24,970 5.4 1,357 3.4 858
Four-Time All-American

**PREFERRED SEX SEMEN
NOW AVAILABLE!**



ANEXO 5. REPORTE DE ESTRUCTURAS OVÁRICAS ENCONTRADAS EN LA INVESTIGACIÓN

REGISTRO DE DONANTE

DONANTE Nombre: BLUEGRAS ENRIQUETA Origen: Ecuatoriana
 RP: HV08 Raza: Charolais Propietario: Sr. Hernan Vásquez

DIAS ABIERTOS TRATAMIENTO 1: 04 meses
DIAS ABIERTOS TRATAMIENTO 2: 6 meses
N° DE PARTOS: 02
DOSIS TOTAL: 17 ml Folltropin-V

SERVICIO TRATAMIENTO 1 Nombre: CERDALE REBEL 3R ORIGEN: CANADA.
 RP: MC294731 Raza: Charolais Fecha: 27 y 28 de Abril del 2012

SERVICIO TRATAMIENTO 2 Nombre: MAJOR PRINCE ORIGEN: ESPAÑA
 RP: 5811599535 Raza: Charolais Fecha: 19 y 20 de Julio del 2012

Tratamiento: Convencional con Estradiol (1) Tratamiento: Con CIDR 12 días y sin Estradiol (2)
COLECCIÓN Fecha: 04/05/2012 **COLECCIÓN** Fecha: 26/07/2012

TRATAMIENTO	HEMERA CHAROLAIS	OVARIOS	FOLÍCULOS ENCONTRADOS		CUERPOS LÚTEOS ENCONTRADOS	FOLÍCULOS SIN OVULAR	OBSERVACIONES
			FOLIC. MADURO	FOLIC. CRECIM.			
1	Enriqueta	Derecho			7	1	Ecografía
		Izquierdo			6	0	Ecografía
2	Enriqueta	Derecho			6	0	Ecografía
		Izquierdo			10	1	Ecografía

REGISTRO DE DONANTE

DONANTE Nombre: OBELIX KIKA Origen: Ecuatoriana
 RP: L005 Raza: Charolais Propietario: Sr. Hernan Vásquez

DIAS ABIERTOS TRATAMIENTO 1: 09 meses
DIAS ABIERTOS TRATAMIENTO 2: 11 meses
N° DE PARTOS: 01
DOSIS TOTAL: 17 ml Folltropin-V

SERVICIO TRATAMIENTO 1 Nombre: JUMPER RELAX ORIGEN: FRANCIA.
 RP: FR7121100262 Raza: Charolais Fecha: 27 y 28 de Abril del 2012

SERVICIO TRATAMIENTO 2 Nombre: MAJOR PRINCE ORIGEN: ESPAÑA
 RP: 5811599535 Raza: Charolais Fecha: 19 y 20 de Julio del 2012

Tratamiento: Convencional con Estradiol (1) Tratamiento: Con CIDR 12 días y sin Estradiol (2)
COLECCIÓN Fecha: 04/05/2012 **COLECCIÓN** Fecha: 26/07/2012

TRATAMIENTO	HEMERA CHAROLAIS	OVARIOS	FOLÍCULOS ENCONTRADOS		CUERPOS LÚTEOS ENCONTRADOS	FOLÍCULOS SIN OVULAR	OBSERVACIONES
			FOLIC. MADURO	FOLIC. CRECIM.			
1	KYKA	Derecho	0	0	1	0	Ecografía
		Izquierdo			4	3	Ecografía
2	KYKA	Derecho	0	0	4	0	Ecografía
		Izquierdo			7	0	Ecografía

REGISTRO DE DONANTE

DONANTE Nombre: Ace Barbara Origen: Ecuatoriana
 RP: 02 Raza: Brown swiss Propietario: Sr. Ignacio Campoverde

DIAS ABIERTOS TRATAMIENTO 1: 06 meses
DIAS ABIERTOS TRATAMIENTO 2: 09 meses
N° DE PARTOS: 01
DOSIS TOTAL: 20 ml Folltropin-V

SERVICIO TRATAMIENTO 1 Nombre: Wondermen Tambark ORIGEN: USA.
 RP: 54BS486 Raza: Brown swiss Fecha: 24 y 25 de Noviembre del 2012

SERVICIO TRATAMIENTO 2 Nombre: Triangle Acres Payoff ET ORIGEN: USA.
 RP: 014BS00288 Raza: Brown swiss Fecha: 07 y 08 de Marzo del 2013

Tratamiento: Convencional con Estradiol (1) Tratamiento: Con CIDR 12 dias y sin Estradiol (2)

COLECCIÓN Fecha: 11/12/2012 **COLECCIÓN** Fecha: 14/03/2013

TRATAMIENTO	HEMBRA CHAROLAIS	OVARIOS	FOLÍCULOS ENCONTRADOS		CUERPOS LÚTEOS ENCONTRADOS	FOLÍCULOS SIN OVULAR	OBSERVACIONES
			FOLIC. MADURO	FOLIC. CRECIM.			
1	Ace Barbara	Derecho	0	0	7	0	Ecografia
		Izquierdo	1		2	1	Ecografia
2	Ace Barbara	Derecho	0	0	7	0	Palpacion
		Izquierdo	2	0	5	2	Palpacion

REGISTRO DE DONANTE

DONANTE Nombre: Cartoon Preciosa Origen: Ecuatoriana
 RP: 03 Raza: Brown swiss Propietario: Sr. Ignacio Campoverde

DIAS ABIERTOS TRATAMIENTO 1: 00 meses
DIAS ABIERTOS TRATAMIENTO 2: 00 meses
N° DE PARTOS:
DOSIS TOTAL: 20 ml Folltropin-V

SERVICIO TRATAMIENTO 1 Nombre: Wondermen Tambark ORIGEN: USA.
 RP: 54BS486 Raza: Brown swiss Fecha: 24 y 25 de Noviembre del 2012

SERVICIO TRATAMIENTO 2 Nombre: Triangle Acres Payoff ET ORIGEN: USA.
 RP: 014BS00288 Raza: Brown swiss Fecha: 07 y 08 de Marzo del 2013

Tratamiento: Convencional con Estradiol (1) Tratamiento: Con CIDR 12 dias y sin Estradiol (2)

COLECCIÓN Fecha: 11/12/2012 **COLECCIÓN** Fecha: 14/03/2013

TRATAMIENTO	HEMBRA CHAROLAIS	OVARIOS	FOLÍCULOS ENCONTRADOS		CUERPOS LÚTEOS ENCONTRADOS	FOLÍCULOS SIN OVULAR	OBSERVACIONES
			FOLIC. MADURO	FOLIC. CRECIM.			
1	Cartoon Preciosa	Derecho	5	0	0	5	Ecografia
		Izquierdo	5	0	0	5	Ecografia
2	Cartoon Preciosa	Derecho	0	0	5	0	Palpación
		Izquierdo	0	0	7	0	Palpación

ANEXO 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INVESTIGACIÓN.

Estructuras ováricas.

		Cuerpos lúteos			
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Total	Promedio
Charolaise	T1	5	13	18	9
	T2	11	16	27	13,5
Brown swiss	T1	9	0	9	4,5
	T2	12	12	24	12
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaise	45	11,25	T1	27	6,75
Brown swiss	33	8,25	T2	51	12,75
		Folículos			
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Total	Promedio
Charolaise	T1	3	1	4	2
	T2	1	0	1	0,5
Brown swiss	T1	1	11	12	6
	T2	2	0	2	1
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaise	5	1,25	T1	16	4
Brown swiss	14	3,5	T2	3	0,75

Cuerpos Lúteos

Animales	Tratamientos		Total	Media
	T1	T2		
Ch1	5	11	16	8
Ch2	13	16	29	14,5
Br3	9	12	21	10,5
Br4	0	12	12	6
Total	27	51	78	9,75
Media	6,75	12,75	9,75	

FC	760,5
SCT	179,5
SCt	72

FV	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	FC 0.05	Significancia
Tratamiento	1	70,75	70,75	7,68	3,46	*
Error experimental	6	55,25	9,21			
Total	7	126,00				

FV	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	FC 0.05	Significancia
Animal	3	45	15,00	0,74	6,59	NS
Error experimental	4	81,00	20,25			
Total	7	126,00				

Embriones Obtenidos

		Embriones		Total	Promedio
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II		
Charolaise	T1	0	6	6	3
	T2	6	12	18	9
Brown swiss	T1	5	0	5	2,5
	T2	2	9	11	5,5
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaise	24	6	T1	11	2,75
Brown swiss	16	4	T2	29	7,25

Animales	Tratamientos		Total	Media
	T1	T2		
Ch1	0	6	6	3
Ch2	6	12	18	9
Br3	5	2	7	3,5
Br4	0	9	9	4,5
Total	11	29	40	5
Media	2,75	7,25	5	

FC	200,00
SCT	126,00
Sct	70,75

FV	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	FC 0.05	Significancia
Tratamiento	1	40,5	40,5	12,90	3,46	*
Error experimental	6	18,83	3,14			
Total	7	59,33				

FV	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	FC 0.05	Significancia
Animal	3	45	15,00	4,19	6,59	NS
Error experimental	4	14,33	3,58			
Total	7	59,33				

Mórulas y blastocistos.

Mórulas					
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Total	Promedio
Charolaise	T1	0	3	3	1,5
	T2	1	8	9	4,5
Brown swiss	T1	0	1	1	0,5
	T2	4	0	4	2
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaise	12	3	T1	4	1
Brown swiss	5	1,25	T2	13	3,25

Blastocistos					
Raza	Tratamiento	Repetición I	Repetición II	Total	Promedio
Charolaise	T1	0	0	0	0
	T2	0	0	0	0
Brown swiss	T1	1	0	1	0,5
	T2	1	0	1	0,5
Raza	Total	Promedio	Tratamientos	Total	Promedio
Charolaise	0	0	T1	1	0,25
Brown swiss	2	0,5	T2	1	0,25

Animales	Tratamientos		Total	Media
	T1	T2		
Ch1	0	1	1	0,5
Ch2	3	8	11	5,5
Br3	0	4	4	2
Br4	1	0	1	0,5
Total	4	13	17	2,125
Media	1	3,25	2,125	

FC	57,80
SCT	33,20
Sct	6,53

FV	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	FC 0.05	Significancia
Tratamiento	1	6,53	6,53	1,47	3,46	ns
Error experimental	6	26,67	4,44			
Total	7	33,20				

FV	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	FC 0.05	Significancia
Animal	3	11,7	3,90	0,73	6,59	ns
Error experimental	4	21,50	5,38			
Total	7	33,20				

ANEXO 7. RESPALDOS FOTOGRÁFICOS.



Ecografía en campo de los animales.



Ecografía en el día del lavado



Trabajo de la primera prueba.



Trabajos de laboratorio.



Lavado de la segunda prueba.



Trabajo con ganado Brown swiss.



Lavado de embriones Brown swiss.

Ecografías antes del lavado de embriones.

Ecografías del primer tratamiento CIDR 8 días más estrógenos.



Trabajos de laboratorio.



Lavado de la segunda prueba.



Trabajo con ganado Brown swiss.



Lavado de embriones Brown swiss.



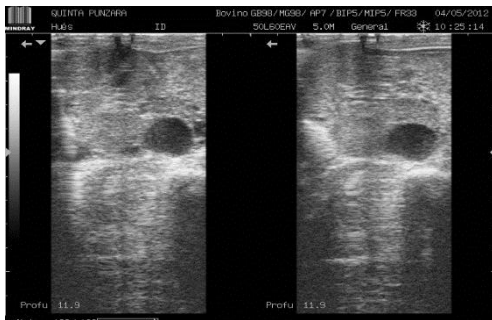
Laboratorio para trabajo con hembras Brown swiss



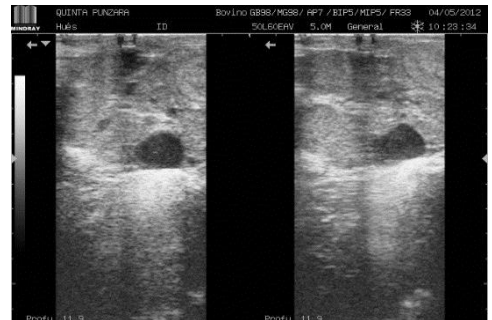
Apoyo del equipo técnico del CEBIREA UNL.

Ecografías antes del lavado de embriones.

Ecografías del primer tratamiento CIDR 8 días más estrógenos.



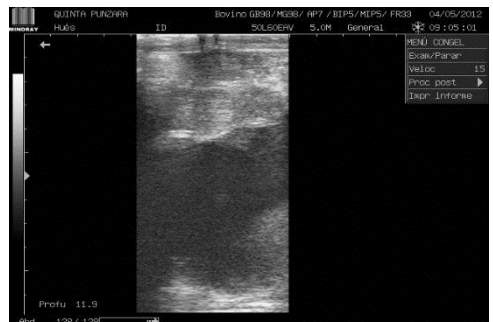
Ecografía 1. Bluegrass Enriqueta Ovario derecho.



Ecografía 2. Bluegrass Enriqueta Ovario Izquierdo.



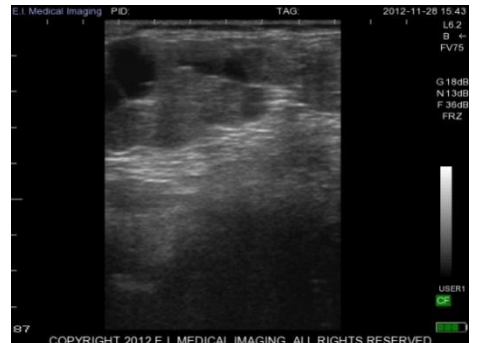
Ecografía 3. Obelix Kika Ovario derecho.



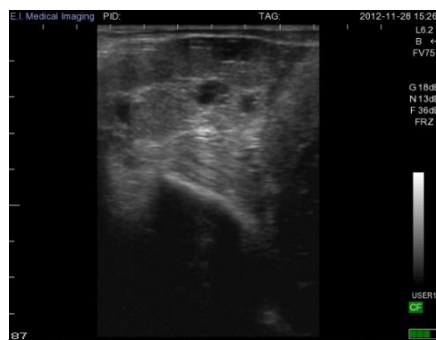
Ecografía 4. Obelix Kika Ovario Izquierda.



Ecografía 5. Cartoon Preciosa ovario derecho



Ecografía 6. Cartoon Preciosa ovario Izquierdo.



Ecografía 7. Ace Bárbara ovario derecho

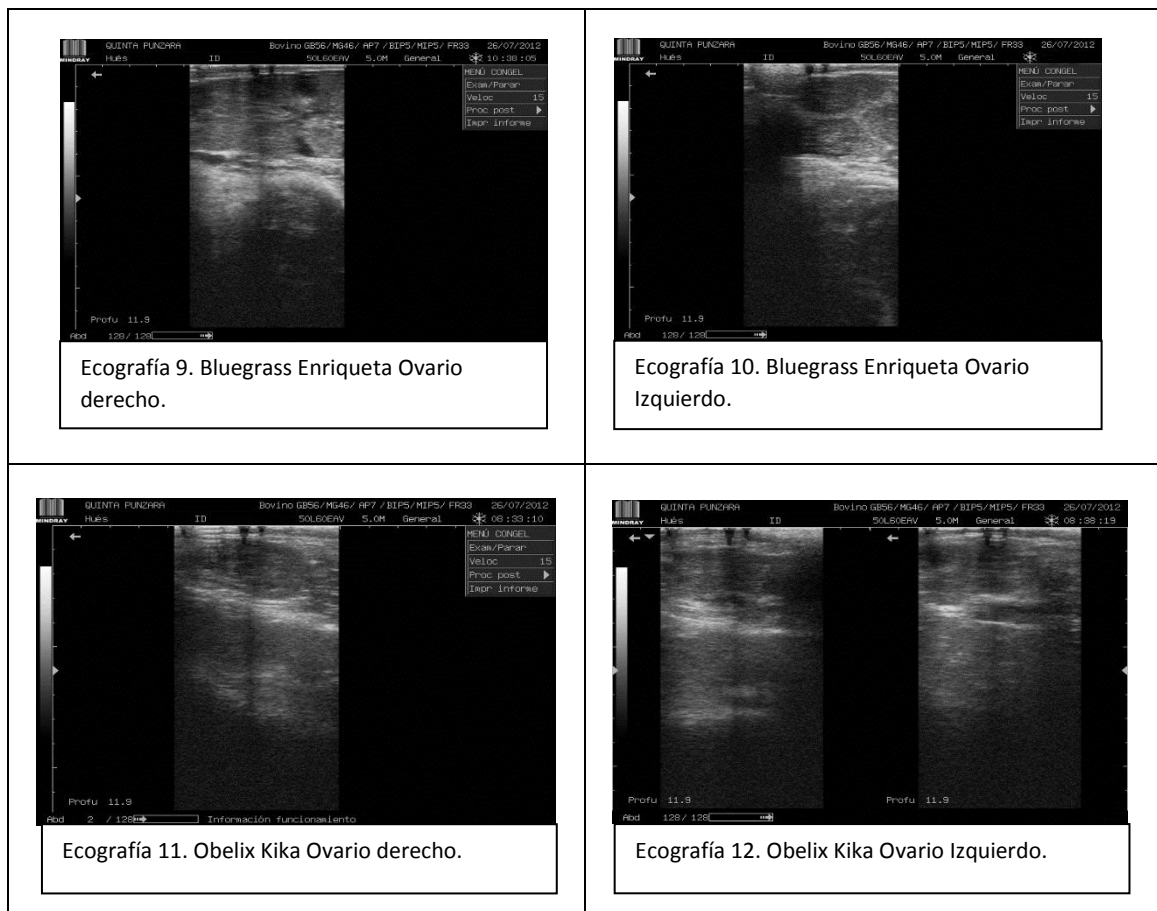


Ecografía 8. Ace Bárbara ovario Izquierdo.

Interpretación de las ecografías.

Donadora	Ovario izquierdo	Ovario derecho
Charolaise Bluegrass Enriqueta	Seis cuerpos lúteos, folículo retenido.	Siete cuerpos lúteos, folículo retenido
Charolaise Obelix Kika	Un cuerpos lúteos, dos folículos retenidos.	Cuatro cuerpos lúteos.
Brown swiss Ace Bárbara	Dos cuerpos lúteos cavitarios	Diez cuerpos lúteos
Brown swiss Cartoon Preciosa	Folículos sin eclosionar.	Folículos sin eclosionar.

Ecografías del Segundo tratamiento CIDR 12 días sin estrógenos.



Donadora	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Observación
Charolaise Bluegrass Enriqueta	Diez cuerpos lúteos.	Seis cuerpos lúteos.	Ecografía
Charolaise Obelix Kika	Siete cuerpos lúteos.	Cuatro cuerpos lúteos.	Ecografía
Brown swiss Ace Barbara	Cinco cuerpos lúteos, dos folículos retenidos	Siete cuerpos lúteos.	Palpación
Brown swiss Cartoon Preciosa	Siete cuerpos lúteos	Cinco cuerpos lúteos	Palpación

ANEXO 8. COSTOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Costos del tratamiento CIDR 8 días con estrógenos (T1) en Hembras Charolaise.

Descripción	Presentación	Cantidad	Precio	Total
Insumos				
Embryo Filter	Unidad	2	22	44
Flush Complete solution Bioniche	Unidad	2	50	100
Catheter folley 16 22	Unidad	2	22	44
Freeze Medium 50 ml	Unidad	2	44	88
Holding Vigro Bioniche	Unidad	3	44	132
Lidocaina	Unidad	1	4	4
Pajillas/straws 25 Ye/Sterile	Caja	5	4	20
Tips/Puntas Micropipette	Caja	1	17	17
Y junction	Unidad	2	15	30
Agujas 16 1 1/2	Caja	4	0,5	2
Caja de jeringas descartables 10 ml	Unidad	12	0,25	3
Agua destilada	Litro	0,5	5,5	2,75
Alcohol etilico	Litro	0,5	2,5	1,25
Nitrogeno	Kg	3	6	18
Pozillos plasticos	Unidad	8	5	40
Cajas petri cuadriculadas	Unidad	6	5	30
Subtotal				576
Equipos				
Equipos alquiler	Alquiler	1	300	300
Subtotal				300
Hormonas tratamiento 1 Convencional				
Prostaglandina	ml	8	5	40
CIDR	implante	2	12	24
GNRH	ml	5	3	15
Folltropin	ml	2	200	400
Progesterona	ml	5	1	5
Grafoleon	ml	2	1	2
Subtotal				486
Dosis de Semen congelado				
Rebel (Charolais)	Pajuelas	2	25	50
Relax (Charolais)	Pajuelas	2	30	60
Subtotal				110
Jornales y movilizacion				
Jornal vaquero	jornal	5	10,2	51
visitas a las fincas	Carrera	10	2	20
Subtotal				71
GRAN TOTAL				1543

Costos del tratamiento CIDR 8 días con estrógenos (T1) en Hembras Brown swiss.

Descripción	Presentación	Cantidad	Precio	Total
Insumos				
Embryo Filter	Unidad	2	22	44
Flush Complete solution Bioniche	Unidad	2	50	100
Catheter folley 16 22	Unidad	2	22	44
Freeze Medium 50 ml	Unidad	2	44	88
Holding Vigro Bioniche	Unidad	3	44	132
Lidocaina	Unidad	1	4	4
Pajillas/straws 25 Ye/Sterile	Caja	5	4	20
Tips/Puntas Micropipette	Caja	1	17	17
Y junction	Unidad	2	15	30
Agujas 16 1 1/2	Caja	4	0,5	2
Caja de jeringas descartables 10 ml	Unidad	12	0,25	3
Agua destilada	Litro	0,5	5,5	2,75
Alcohol etilico	Litro	0,5	2,5	1,25
Nitrogeno	Kg	3	6	18
Pozillos plasticos	Unidad	8	5	40
Cajas petri cuadriculadas	Unidad	6	5	30
Subtotal				576
Equipos				
Equipos alquiler	Alquiler	1	300	300
Subtotal				300
Hormonas tratamiento 1 Convencional				
Prostaglandina	ml	8	5	40
CIDR	implante	2	12	24
GNRH	ml	5	3	15
Folltropin	ml	2	200	400
Progesterona	ml	5	1	5
Grafoleon	ml	2	1	2
Subtotal				486
Dosis de Semen congelado				
Payoff(Brown swiss)	Pajuelas	2	25	50
Tambark (Brown swiss)	Pajuelas	2	25	50
Subtotal				100
Jornales y movilizacion				
Jornal vaquero	jornal	5	10,2	51
visitas a las fincas	Carrera	10	5	50
Subtotal				101
GRAN TOTAL				1563

Costos del tratamiento CIDR 12 días sin estrógenos (T2) en Hembras Charolaise.

Descripción	Presentación	Cantidad	Precio	Total
Insumos				
Embryo Filter	Unidad	2	22	44
Flush Complete solution Bioniche	Unidad	2	50	100
Catheter folley 16 22	Unidad	2	22	44
Freeze Medium 50 ml	Unidad	2	44	88
Holding Vigro Bioniche	Unidad	3	44	132
Lidocaina	Unidad	1	4	4
Pajillas/straws 25 Ye/Sterile	Caja	5	4	20
Tips/Puntas Micropipette	Caja	1	17	17
Y junction	Unidad	2	15	30
Agujas 16 1 1/2	Caja	4	0,5	2
Caja de jeringas descartables 10 ml	Unidad	12	0,25	3
Agua destilada	Litro	0,5	5,5	2,75
Alcohol etilico	Litro	0,5	2,5	1,25
Nitrogeno	Kg	3	6	18
Pozillos plasticos	Unidad	8	5	40
Cajas petri cuadriculadas	Unidad	6	5	30
Subtotal				576
Equipos				
Equipos alquiler	Alquiler	1	300	300
Subtotal				300
Hormona tratamiento 2 CIDR 12 días				
Prostaglandina	ml	8	5	40
CIDR	implante	2	12	24
GNRH	ml	10	3	30
Folltropin	ml	2	200	400
Subtotal				494
Dosis de Semen congelado				
Prince (Charolais)	Pajuelas	2	60	120
Le Rebel (Charolais)	Pajuelas	2	25	50
Subtotal				170
Jornales y movilizacion				
Jornal vaquero	jornal	8	10,2	81,6
visitas a las fincas	Carrera	12	2	24
Subtotal				105,6
GRAN TOTAL				1645,6