

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Biotechnologías reproductivas en bovinos, sincronización y
transferencia de embriones *in vivo* realizada en el Instituto de
Reproducción Animal Córdoba, Argentina.**

Modalidad: Pasantía

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Cinthy Pamela Brenes Jiménez

**Campus Pbro. Benjamín Núñez
2014**

Biotechnologías reproductivas en bovinos, sincronización y transferencia de embriones *in vivo* realizada en el Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Argentina.

María Antonieta Corrales

Decana

Dra. Laura S. Bouza Mora

Subdirectora

Dr. Jaime Murillo

Tutor

Dra. Sandra Estrada

Lectora

Dr. Rafael Vindas

Lector

DEDICATORIA

A Dios, por su eterno amor.

A mis padres, por su apoyo incondicional.

“Hace mucho tiempo se me apareció el Señor y me dijo: Con amor eterno te he amado; por eso te sigo con fidelidad”. Jeremías 31:3

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por estar siempre a mi lado, ser mi guía, mostrarme su amor y misericordia, por darme las fuerzas para culminar con éxito esta etapa tan importante y porque cada día puedo ver su mano sobre mí. Gracias a mis padres por motivarme e impulsarme a cumplir este sueño, por sus consejos y su amor. Gracias a la Universidad Nacional y a la Escuela de Medicina Veterinaria por permitirme estudiar esta hermosa carrera. Al Dr. Gabriel Bó y al Dr. Ricardo Tribulo por recibirme como pasante y contribuir a mi formación académica, también al personal del IRAC y a mis compañeros de pasantía. Le agradezco al Dr. Jaime Murillo por ser un docente ejemplar, por sus palabras de aliento y motivación. A los lectores de este trabajo la Dra. Sandra Estrada y el Dr. Rafael Vindas, por su disposición y su conocimiento impartido durante la carrera de Medicina Veterinaria. Gracias a mi familia y amigos que han estado a mi lado durante este proceso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTO	2
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	3
ÍNDICE DE CUADROS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Antecedentes	12
1.2. Justificación	18
1.2.1. Importancia.....	18
1.3. Objetivos.....	20
1.3.1. Objetivo general	20
1.3.2. Objetivos específicos.....	20
2. METODOLOGÍA	21
2.1. Protocolos de superovulación en vacas donantes de embriones.....	21
2.2. Técnica de colección de embriones	22
2.3. Búsqueda y clasificación de embriones	24
2.4. Criopreservación de embriones.....	29
2.5. Etiquetado de pajuelas, visotubos y canisteres	30
2.6. Sincronización de receptoras de embriones.....	31
2.7. Técnica de transferencia de embriones	32

3. RESULTADOS	34
3.1. Respuesta al tratamiento de superovulación en vacas donantes de embriones.....	34
3.2. Clasificación embrionaria	34
3.3. Tasa de aprovechamiento y tasa de preñez en vacas receptoras de embriones	35
4. DISCUSIÓN.....	36
5. CONCLUSIONES	42
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7. ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Protocolo estándar de superovulación utilizado en donantes de embriones bovinos de la raza Brangus.	22
Cuadro 2. Respuesta superovulatoria ($X \pm DS$) de donantes de embriones bovinos de las razas Brangus, Braford y Aberdeen Angus.	34
Cuadro 3. Porcentaje de embriones grado 1 y 2 del promedio de embriones congelados por vaca donante y porcentaje de embriones en estadios de desarrollo 4, 5 y 6.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios del desarrollo embrionario, clasificación según la IETS (Stringfellow y Siedel, 2000).....	27
Figura 2. Método para cargar un embrión en una pajuela de 0,25 ml (Bó, 2012).....	29
Figura 3. Identificación de un embrión dentro de la pajuela.	31
Figura 4. Identificación de visotubos y canisteres. Para almacenar y transportar embriones.	31
Figura 5. Protocolo de sincronización para TETF utilizado en receptoras de embriones bovinos producidos <i>in vivo</i>	32

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BE: benzoato de estradiol

°C: grados Celsius

CIDR®: dispositivo intravaginal a base de progesterona natural micronizada para el control del ciclo estral en bovinos, Pfizer

CL: cuerpo lúteo

cm: centímetro

DIB®: dispositivo intravaginal de liberación lenta de progesterona, Syntex

DS: desviación estándar

eCG: gonadotropina coriónica equina

FCS: suero fetal bovino

FSH: hormona folículo estimulante

g: gramo

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina

IATF: inseminación artificial a tiempo fijo

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones

i.m: intramuscular

IRAC: Instituto de Reproducción Animal Córdoba

LH: hormona luteinizante

M: molar

MCI: macizo celular interno

mg: miligramo

ml: mililitro

mm: milímetro

P4: progesterona

PBS: buffer fosfato salino

PGF: prostaglandina

TETF: transferencia de embriones a tiempo fijo

μg : microgramo

UI: unidades internacionales

μl : microlitro

μm : micrómetro

vs: versus

X: promedio

RESUMEN

La pasantía se realizó en el Instituto de Reproducción Animal Córdoba, localizado en la provincia de Córdoba, Argentina; centro reconocido por su constante aporte en el área de la biotecnología reproductiva aplicada a bovinos y a la capacitación de médicos veterinarios. Las técnicas que favorecen el rápido avance en los programas de mejoramiento genético, han tomado gran importancia debido a la alta demanda y búsqueda de productividad; en la actualidad, la transferencia de embriones es utilizada en todo el mundo y se transfieren más de 500.000 embriones bovinos por año.

Los programas de superovulación tienen como objetivo principal, inducir el mayor número de ovulaciones, que resulten en un alto número de embriones transferibles y en aceptables tasas de preñez luego de la transferencia.

Para los programas de superovulación se utilizaron en total 45 vacas donantes de embriones, de las razas Brangus, Braford y Aberdeen Angus, obteniéndose en promedio 8,5; 2,0 y 2,7 embriones congelados por animal por raza, respectivamente.

La variabilidad individual es un factor siempre presente en un programa de transferencia de embriones, ya que existen animales que responden al tratamiento de superestimulación de manera excelente, regular o mala. En la presente pasantía el 29,2% vacas de la raza Brangus y 66,7% de Braford, presentaron nula respuesta al tratamiento superovulatorio, catalogándose como vacas problema.

En cuanto a los porcentajes de preñez de las receptoras de embriones congelados se alcanzó una tasa de aprovechamiento del 79,2% y una tasa de preñez del 47,6%. Finalmente, la

aplicación de tratamientos que controlan la dinámica folicular y la ovulación, ofrecen la ventaja de poder programar los protocolos de superovulación rápidamente, obviando la detección de celo y realizando la transferencia de embriones a tiempo fijo.

ABSTRACT

The internship was performed in the Instituto de Reproducción Animal Córdoba (Institute of Animal Reproduction Córdoba) localized in the province of Córdoba, Argentina. The institute is recognized for its constant contribution to the reproductive biotechnology field applied in bovines, it is also recognized for training veterinary physicians.

The techniques that benefit the quick progress of the genetic enhancement programs have become important due to the high demand and the search for productivity. Currently the embryo transfer is used worldwide and more than 500.000 bovine embryos are transferred every year.

The aim of the superovulatory programs is to induce a larger number of ovulations that result in a higher number of transferable embryos and in an acceptable pregnancy rate after the transfer.

A total of 45 embryo donor cows were used for the superovulation programs from the Brangus, Braford and Aberdeen-Angus breeds, obtaining an average of 8.5, 2.0 and 2.7 frozen embryos per breed respectively.

The individual variability is a factor that is always present in an embryo transfer program since there are animals that respond to the superstimulation treatment in an excellent, regular

or bad form. The cows did not respond to the superovulatory treatment were 29.2% for Brangus breed and 66.7% for Braford breed, these breeds were cataloged as “Cattle problem”.

The pregnancy rates achieved in the cows that received frozen embryos were: 79.2% of performance ratio and 47.6% of pregnancy rate. Finally, the application of treatments that control follicular dynamics and ovulation, offer the advantage programing superovulation protocols in a faster way, ignoring heat detection and performing fixed-time embryo transfer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

En las últimas décadas han tomado gran importancia las biotecnologías que favorecen el rápido avance en los programas de mejoramiento genético, dentro de las cuales se destaca la transferencia de embriones (Bó y Mapletoft, 2003; Thibier, 2006). La transferencia de embriones es la técnica por la cual los embriones son colectados de una hembra donante y transferidos a una hembra receptora que sirve como madre sustituta durante la preñez (Bó, 2012).

A principios de los años 70, la transferencia de embriones tomó gran atractivo sobre todo comercial, momento en el que se importaron razas europeas de doble propósito a Norte América y por su escasez eran extremadamente valiosas (Mapletoft y Hasler, 2005). En esta época existía mucho incentivo económico para la aplicación de la transferencia de embriones, debido a que los criadores necesitaban un método que aumentara el porcentaje reproductivo de sus hembras, situación que favoreció el desarrollo e investigación de la técnica (Bó, 2012).

La superovulación y transferencia de embriones aumentan en casi dos veces la tasa de ganancia genética obtenida con respecto a las estrategias de reproducción tradicional en un rebaño (Land y Hill, 1975). Esto es debido al incremento del potencial de producción de una hembra con genética superior, ya que cuando una vaca es mantenida en condiciones naturales favorables, tiene el potencial de producir una cría por año con un intervalo entre partos de 12 meses; en cambio con la superovulación, puede multiplicar mucho más su descendencia y producir 25 o más terneros por año (Bó y Mapletoft, 2003).

El objetivo principal en los programas de superovulación en bovinos, es inducir el mayor número de ovulaciones que resulten en un alto número de embriones transferibles y en aceptables tasas de preñez luego de la transferencia (Adams, 1994; Bo et al., 2002). Sin embargo, existe una gran variabilidad en la respuesta de las vacas donantes a tratamientos superovulatorios, lo que implica un factor de costo importante para la industria de la transferencia de embriones.

Looney en 1986, realizó un trabajo que incluyó 2048 colecciones de embriones en donantes bovinas, obtuvo un promedio de 11,5 ovocitos/embriones y 6,2 embriones transferibles por vaca. Se descubrió la gran variabilidad que existe en la respuesta a la superovulación y la producción de embriones, puesto que el 24% de las colecciones no produjeron embriones viables, 64% produjeron menos embriones transferibles que el número promedio y el 30% de las colecciones produjeron el 70% de los embriones.

En otro estudio realizado por Hahn en 1992, que incluyó 987 vacas lecheras, se obtuvo un promedio de embriones ligeramente menor, pero la variación entre las respuestas de distintos animales fue similar. Ochoa y colaboradores (2009), analizaron datos de 831 colectas realizadas en el centro IRAC-BIOGEN, este trabajo mostró que el número promedio de embriones transferibles fue de 6,8 y los porcentajes de producción fueron similares a los dos trabajos anteriormente mencionados.

Si bien los avances en el conocimiento de los últimos años no han 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., 1995b; Bó et al., 2002) y la ovulación (Baruselli et al., 2006; Bó et

al., 2006b) han permitido la superovulación de grupos de donantes independientemente del momento del ciclo estral en que se encuentran y la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), 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 o disponibilidad del personal en la detección de celos (Carballo, 2012).

Tradicionalmente los protocolos de superovulación se iniciaban en la fase luteal media, aproximadamente entre los días nueve y 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 nueve y diez del ciclo (Ginther et al., 1989; Bó y Caccia, 2002). 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 uno o dos días más tarde (Nasser et al., 1993; Adams et al., 1994) (Bó et al., 1995a; Bergfelt et al., 1997).

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

Este tratamiento es utilizado por muchos profesionales alrededor del mundo (Beal, 1999; Mapletoft et al., 2000; Baruselli et al., 2006; Bó et al., 2006a), pero debido a que el uso de estas hormonas ha sido restringido en países como Estados Unidos, Nueva Zelanda y en la

Unión Europea; se creó la necesidad de desarrollar tratamientos que sincronicen el comienzo de una nueva onda folicular, que no utilicen esteres de estradiol.

Un método alternativo consiste en eliminar por punción guiada por ultrasonido, todos los folículos mayores o iguales a cinco milímetros y de este modo inducir una nueva onda folicular, aproximadamente 1,5 días después (Bergfelt et al., 1994). De esta manera se puede comenzar el protocolo de superovulación uno o dos días después de la ablación folicular (Bergfelt, 1997; Beal, 1999; Kim et al., 2001).

Otra alternativa es la utilización de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o de la hormona luteinizante (LH) para inducir la ovulación del folículo dominante y así tener el inicio de una nueva onda folicular 1,5 a dos días después (Pursley et al., 1995); pero el comienzo de la nueva onda es sincronizado solamente cuando el tratamiento resulta en la ovulación del folículo dominante (Martinez et al., 1999).

En un estudio realizado por Wock y colaboradores (2008), 411 vacas lecheras fueron superovuladas seguido del uso de GnRH o estradiol para sincronizar la emergencia de la onda folicular. Los animales tratados con GnRH recibieron un dispositivo intravaginal de progesterona CIDR® en días aleatorios del ciclo estral (día 0), la GnRH fue inyectada el día tres y la superestimulación iniciada 48 horas más tarde. Las otras donantes fueron superestimuladas cuatro días después de la inserción del dispositivo intravaginal CIDR® y la administración de 4 mg de estradiol-17 β . El análisis de los datos no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos tratados con estradiol o GnRH en cuanto al número de embriones recuperados ($9,8 \pm 0,6$ vs $9,7 \pm 0,7$), ni en los grados de calidad 1 y 2 ($4,7 \pm 0,4$ vs $4,5 \pm 0,4$).

El éxito de un programa de transferencia de embriones se mide por el número de terneros que nacen vivos por hembra donante en un determinado lapso de tiempo. Esto está influenciado por los factores relacionados con el número de ovulaciones, la fertilización y viabilidad de los embriones y aquellos factores relacionados con el manejo de las donantes y receptoras (Armstrong, 1993). Uno de los puntos críticos de la técnica de transferencia de embriones es el alto costo por receptora preñada (Beal and Hinshaw, 2001).

Las tasas de concepción varían entre 40 y 70% dependiendo del uso de embriones frescos o congelados (Lohouis et al., 1993, Stroud y Hasler, 2006). El desarrollo de protocolos efectivos de sincronización de la ovulación para evitar la detección de celo en programas de IATF ha permitido la inseminación masiva de vacas y novillas (Bó et al., 2002a, 2002b), lo que ha traído como consecuencia el desarrollo de métodos en forma sistemática o también llamada transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF) (Beal y Hinshaw, 2001; Bó et al., 2002; Mapletoft et al.; 2003 Baruselli et al., 2005).

Por ende es necesario controlar el desarrollo folicular y la ovulación mediante el uso de diferentes tratamientos hormonales, tales como la combinación de estradiol y progestágenos, junto con la aplicación de GnRH o LH (Thatcher et al., 1989; Bó et al., 1995a; Pursley et al., 1995; Martínez et al., 1999; Caccia, 2003).

En cuanto a las tasas de preñez, Tríbulo y colaboradores en 1997, obtuvieron índices de preñez de 62,7% en receptoras de embriones tratadas con un dispositivo intravaginal CIDR® combinado con 2 mg de benzoato de estradiol (EB) y 50 mg de progesterona (P4) en el día 0, prostaglandina (PGF) al momento de la remoción de CIDR® (día 7) y 1 mg de EB a las 24 horas (día 8), considerando el día 9 como día de celo; estas receptoras recibieron embriones

congelados grado uno según las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) el día 16. Adicionalmente, la aplicación de 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) en el día 5 del tratamiento resulta en una mayor cantidad de vacas preñadas debido a que aumenta el número de receptoras seleccionadas para ser transferidas (Moreno et al., 2001a, Nasser et al., 2004).

Las técnicas de colección de embriones consisten en el lavado interno de los cuernos uterinos y se clasifican en técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas. La técnica quirúrgica fue el primer procedimiento que se empleó para la transferencia de embriones, y radicaba en abordar el útero mediante una laparotomía costal o por línea alba; hoy en día, esta técnica no se utiliza en ningún lugar del mundo.

La técnica no quirúrgica consiste en la introducción de una sonda a través de la vagina hasta su ubicación en el útero y la introducción de un medio de lavado apropiado para el útero y la recuperación de los embriones; existen dos modalidades diferentes para esta técnica, recuperación por gravedad con circuito cerrado y recuperación por aspiración interrumpida o también llamado método de la jeringa (Bó, 2012).

La IETS dicta las pautas estandarizadas para la certificación e identificación de los embriones mediante códigos numéricos para la fase de desarrollo y grados de calidad del embrión.

El diámetro de un ovocito es de aproximadamente 150 - 190 μm , incluyendo el grosor de la zona pelúcida, tamaño que permanece sin variación desde el estado de una célula hasta el estado de blastocisto expandido, el número de células de un embrión puede ser contado sin dificultad hasta el estado de 16 células. Cuando el embrión alcanza el estado de 32 células se produce la compactación, en la que las blastómeras pierden su forma esférica y comienzan a

adherirse entre ellas, en este estado el embrión recibe el nombre de mórula. Luego las blastómeras comienzan a diferenciarse dando origen a dos tipos de células, las células del trofoblasto que dará origen a la placenta, y las células del macizo celular interno (MCI) que dará origen al feto. A partir de este momento comienza a formarse una cavidad interna que se denomina blastocele y el embrión comienza a llamarse blastocisto. Los estadios de desarrollo del embrión se identifican de acuerdo a su desarrollo morfológico, de la siguiente manera: no fecundado, embriones de dos a 12 células, mórula temprana, mórula, blastocisto temprano, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclosionado y blastocisto eclosionado expandido (Stringfellow y Siedel, 2000; Bó, 2012).

La criopreservación de embriones bovinos es una técnica esencial asociada a la práctica comercial de la transferencia de embriones. Los protocolos de criopreservación fueron diseñados para proteger los embriones contra la formación de cristales de hielo intracelular durante el congelado y la recristalización durante el descongelado (Bó, 2012).

1.2. Justificación

1.2.1. Importancia

Durante los últimos años, el uso de nuevas tecnologías, especialmente las relacionadas con reproducción animal, han adquirido gran importancia para mejorar la producción pecuaria en el mundo. Entre las nuevas tecnologías, aquellas relacionadas con la transferencia de embriones han sido utilizadas durante casi treinta años para reproducir y mejorar la genética (Bó et al., 2006b), además comercialmente se ha convertido en un gran negocio internacional (Mapletoft y Hasler, 2005).

En la actualidad, la transferencia de embriones es muy utilizada en todo el mundo y se transfieren más de 500.000 embriones por año (Thibier, 2003). Esta tecnología aumenta el número de descendencia obtenida de donantes de alto valor genético y se utiliza para difundir la genética deseable en todo el mundo (Baruselli, 2006).

Datos más recientes publicados por la IETS, muestran que en el año 2011 se realizaron 118.128 colectas en bovinos, obteniendo 732.862 embriones transferibles. De los cuales 248.193 fueron transferidos en fresco y 324.149 transferidos congelados, generando un total de 572.342 embriones transferidos a nivel mundial en el año 2011.

En dicho informe para el año 2011 en Costa Rica no se registró actividad de transferencia de embriones por parte de médicos veterinarios nacionales miembros de la IETS, pero si se registró actividad realizada en el país por practicantes extranjeros (Stroud, 2012).

En Costa Rica así como el resto del mundo, el crecimiento del sector agropecuario ha obligado a los productores a ser más eficientes; lo que conlleva a la búsqueda e implementación de técnicas que logren mejorar la producción y en este caso mejorar la eficiencia reproductiva. Es importante generar conocimiento y mayor capacitación en cuanto a biotecnologías reproductivas como la transferencia de embriones, que logren ampliar la capacidad de producción de un hato para suplir la demanda actual de mayor cantidad y mejor calidad de carne y leche, al mismo tiempo que contribuyan al mejoramiento genético.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Adquirir el conocimiento teórico y la destreza práctica en las técnicas de biotecnologías reproductivas como ultrasonografía, inseminación artificial, colecta y transferencia de embriones en bovinos, con el fin de obtener experiencia profesional en el área de reproducción de especies mayores.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Utilizar los protocolos más indicados para el tratamiento de superovulación en las vacas donantes de embriones; así como para la sincronización de vacas receptoras de embriones.
2. Adquirir el conocimiento teórico y práctico del método de colecta de embriones en vacas donantes.
3. Adquirir el conocimiento teórico y práctico del método de transferencia de embriones en fresco y congelado en vacas receptoras.

2. METODOLOGÍA

2.1. Protocolos de superovulación en vacas donantes de embriones

Se utilizaron en total 45 vacas donantes de embriones, ciclando y con una condición corporal entre 2,5 y 4 (escala 1 - 5), del centro IRAC-BIOGEN, para los protocolos de superovulación y colecta; divididas por raza de la siguiente manera: 24 vacas Brangus, 18 vacas Braford y tres vacas Aberdeen Angus. Los tratamientos de superovulación y colecta de embriones se realizaron en seis fechas diferentes.

El protocolo estándar de superovulación utilizado se resume en el Cuadro 1, este consistió en realizar un examen reproductivo guiado por ecografía (ultrasonido Mindray DP-30Vet) en el día de inicio denominado día 0, seguido por la aplicación de un dispositivo intravaginal de liberación lenta (DIB® 1 g de progesterona, Syntex S.A) en conjunto con la administración intramuscular de 2,5 mg de BE (Gonadiol 1 mg/ml, Syntex S.A) y 50 mg de P4 (Progestar 25 mg/ml, Syntex S.A) (Bó et al, 1998; Moreno et al, 2001b; Colazo et al, 2007). El día 4 se comenzó el tratamiento de superestimulación folicular con Folltropin®-V (FSH, 20%LH, Bioniche Animal Health Canadá Inc), administrado cada 12 horas vía intramuscular, en dosis decrecientes durante cuatro días (Chupin et al., 1984; González et al., 1990). Se utilizó una dosis total entre 200 y 300 mg (10 a 15 ml) de Folltropin®-V por animal según la raza y la historia de respuesta a tratamientos anteriores; 200 mg a las Brangus, 300 mg a las Braford y 260 mg a las Aberdeen Angus (Bó, 2012). El día 6 se realizaron dos aplicaciones de 500 µg de cloprostenol (Ciclase DL 250 µg/ml, Syntex S.A) con un intervalo de 12 horas. El día 7 se retiró el dispositivo intravaginal de P4 y a las 24 horas (día 8) se aplicó una dosis de 100 µg de GnRH (Gonasyn 50 µg/ml, Syntex S.A) para inducir la ovulación (Baruselli et al, 2006). Por

último se realizó la IATF con semen de alta fertilidad a las 12 y 24 horas de la aplicación de GnRH. El día 15 se realizó la colecta de embriones.

Cuadro 1. Protocolo estándar de superovulación utilizado en donantes de embriones bovinos de la raza Brangus.

Día	Hora	Tratamiento	
			Folltropin-V
0		DIB + 2,5 mg BE + 50 mg P4	
4	a.m		2,0 ml
	p.m		2,0 ml
5	a.m		1,5 ml
	p.m		1,5 ml
6	a.m	2 ml de PGF	1,0 ml
	p.m	2 ml de PGF	1,0 ml
7	a.m	Retirar dispositivo	0,5 ml
	p.m		0,5 ml
8	a.m	GnRH	
	p.m	IA 1	
9	a.m	IA2	
15		Colecta	

2.2. Técnica de colección de embriones

El procedimiento de colecta de embriones consistió en el lavado intraurino utilizando PBS, el cual es un medio de lavado apropiado para el útero y para la recuperación posterior de los embriones. Las colectas se realizaron siete días después de la IATF, mediante el uso de una técnica no quirúrgica en su método variante de recuperación por aspiración interrumpida.

El procedimiento utilizado para las colectas de embriones se describe a continuación:

- a. En primer lugar se evacuó las heces del recto y se realizó palpación transrectal para estimar el número de cuerpos lúteos presentes.
- b. Se aplicó anestesia epidural, utilizando cinco mililitros de lidocaína al 2%.

- c. Se realizó la limpieza del área perineal y perivulvar con abundante agua y secado con papel toalla.
- d. Para las colectas se utilizaron catéteres Foley de dos vías, a los cuales se les colocó por dentro un mandril metálico para darle rigidez. Este se introdujo a través de la vagina y el cerviz, direccionándolo hacia uno de los cuernos uterinos. Una vez ubicado en el cuerno, se retiró el mandril unos dos a tres centímetros y se empujó el catéter suavemente hasta localizarlo en la mitad craneal del cuerno.
- e. Se procedió a inflar el balón del catéter Foley con cinco mililitros de solución salina, verificando su correcta posición mediante palpación rectal. En este punto se retiró completamente el mandril del catéter.
- f. Utilizando el método de recuperación por aspiración interrumpida, el medio de lavado fue introducido por jeringas que se adosaron al catéter; el contenido fue aspirado con la misma jeringa y depositado en el filtro colector (filtros descartables estériles Veterinary Concepts Spring Valley, USA), los filtros fueron previamente identificados con el número de la vaca, número de cuerpos lúteos y operador. Se comenzó con dos lavados de 20 ml de la solución buffer fosfato salino (PBS) y a medida que el cuerno uterino se fue distendiendo, se aumentó el volumen de cada jeringa paulatinamente, hasta un volumen máximo de 35 ml. Se utilizaron en total ocho jeringas equivalentes a 220 ml por cada cuerno.
- g. Los pasos desde la colocación del catéter hasta la recuperación de los embriones, se repitieron para el lavado del segundo cuerno uterino.

- h. Una vez terminada la colecta de ambos cuernos uterinos, se desinfló el balón del catéter antes de proceder a retirarlo por completo.
- i. El filtro de colecta se trasladó al área de laboratorio, donde se dio inicio la etapa de búsqueda y clasificación de los embriones.

2.3. Búsqueda y clasificación de embriones

Los filtros de colecta se recibieron en el primer cuarto del laboratorio, lugar donde se filtró el excedente del medio de lavado. Para recuperar los embriones se lavó la malla de cada filtro con PBS utilizando una jeringa y aguja fina, el fluido se colectó en placas de Petri estériles y descartables (100 x 15 mm). Las placas identificadas con el número de cada animal, se trasladaron al segundo cuarto de laboratorio donde se procedió a la búsqueda y clasificación de los embriones.

La búsqueda y clasificación se efectuó utilizando lupas estereoscópicas con una magnificación de 10X; para facilitar la búsqueda, se colocó debajo de cada placa de Petri una placa cuadrículada, en cada placa se revisó al menos dos veces más luego de encontrado el último embrión.

A medida que se fueron encontrando los embriones, se colocaron en una placa de Petri pequeña (35 mm de diámetro) que contenía medio de mantenimiento (PBS más 10 - 20% de suero fetal bovino); para cambiar los embriones de placa se utilizaron micropipetas de cinco y diez microlitros con tips desechables. Cuando la búsqueda se completó, se hizo una primera clasificación de los embriones/ovocitos colectados y todos los embriones fueron lavados diez veces, este lavado se realizó en una nueva placa de Petri pequeña, en donde se pasaron los

embriones por tres gotas de medio Holding (Bioniche), dos gotas de tripsina (Bioniche) y siete gotas más de medio Holding; cambiando el tip entre cada lavado. Luego fueron evaluados nuevamente y colocados en una placa Petri pequeña, que contenía etilenglicol 1,5 M (medio crioprotector), debido a que los embriones de todas las colectas fueron destinados a criopreservación.

Para la clasificación de los embriones se utilizó la guía propuesta por la IETS, en la cual los embriones fueron clasificados según el estado de desarrollo y la calidad (Stringfellow y Siedel, 2000).

- a. Estado de desarrollo, en la Figura 1 se ejemplifican los siguientes estadios de desarrollo.

Estadio 1: No fecundado.

Estadio 2: De dos a 12 células. Embriones con dos a 12 células, aproximadamente del día 2 al día 5 de desarrollo.

Estadio 3: Mórula temprana. Se asemeja a una mora. Las blastómeras todavía se pueden llegar a distinguir unas de otras. La masa de células ocupa casi todo el espacio perivitelino. Día 5 - 6 de desarrollo.

Estadio 4: Mórula. Las blastómeras se han adherido formando una masa compacta, el embrión ocupa el 60-70% del espacio perivitelino. Día 6 de desarrollo.

Estadio 5: Blastocisto temprano. Presenta una cavidad con fluido denominada blastocele, el embrión ocupa el 70-80% del espacio perivitelino; es posible comenzar a diferenciar el trofoblasto y el macizo celular interno. La edad estimada es de siete días.

Estadio 6: Blastocisto. Presenta una clara diferencia entre el trofoblasto externo y el macizo celular interno (el cual se observa más oscuro). El blastocisto es identificado con claridad. La edad estimada de desarrollo es de siete a ocho días.

Estadio 7: Blastocisto expandido. El diámetro total aumenta 1,2 a 1,5 veces. La zona pelúcida se adelgaza aproximadamente un tercio del grosor original. Los embriones en este estado se pueden encontrar colapsados. Día 8 - 9 de desarrollo.

Estadio 8: Blastocisto eclosionado. En este estado los embriones pueden estar en el proceso o estar completamente fuera de la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados son esféricos con el blastocele bien formado o colapsado. Se encuentran en el día 9 de desarrollo.

Estadio 9: Blastocisto eclosionado expandido.

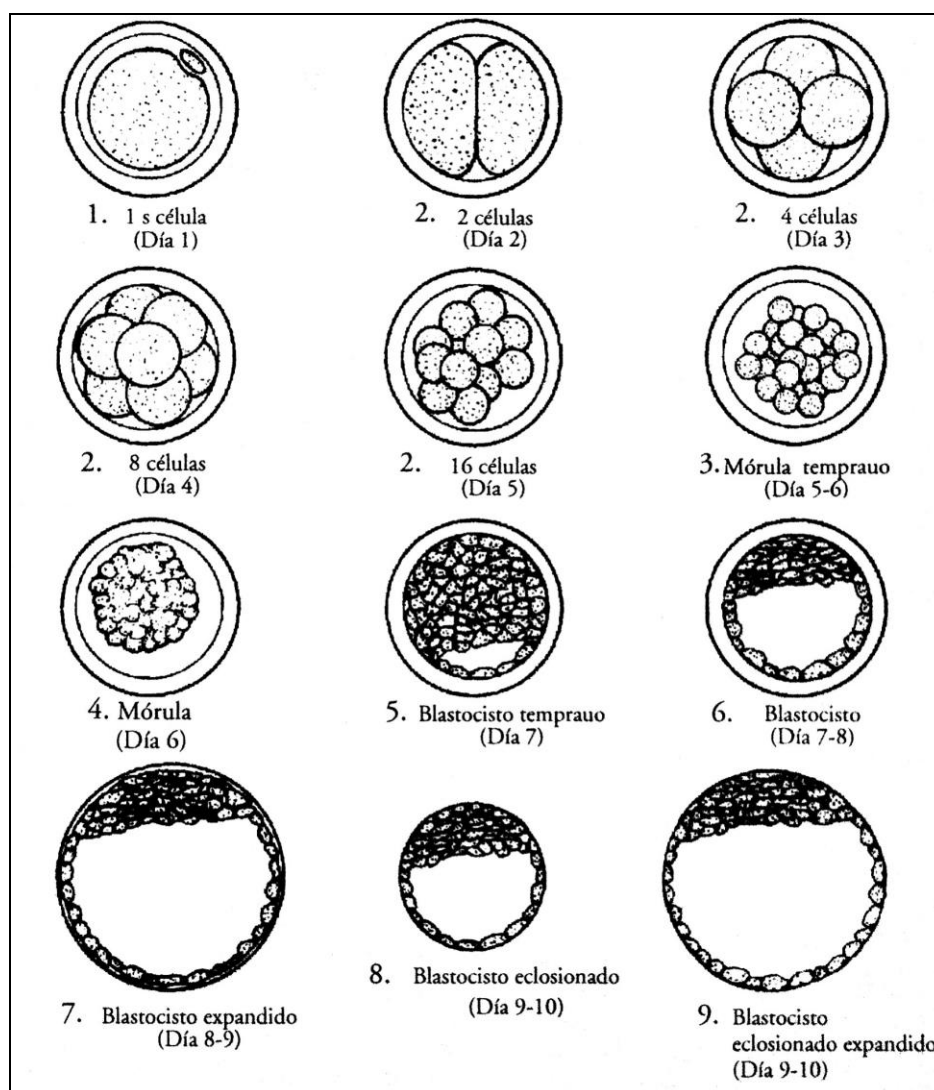


Figura 1. Estadios del desarrollo embrionario, clasificación según la IETS (Stringfellow y Siedel, 2000).

- b. Calidad: se calificaron con base en sus características morfológicas de manera subjetiva.

Grado 1: Excelente o bueno. La masa embrionaria es simétrica y esférica, con blastómeros individuales uniformes en tamaño, color y densidad, el estado de desarrollo del embrión es consistente con la fase de desarrollo esperada, presenta irregularidades

relativamente menores y por lo menos el 85% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria. La zona pelúcida debe ser lisa y no debe tener ninguna superficie cóncava o delgada que podría causar que el embrión se adhiera a la placa de cultivo o a la pajuela.

Grado 2: Regular. Presenta irregularidades moderadas en la forma global de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Por lo menos el 50% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria.

Grado 3: Malo. Presenta irregularidades mayores en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Por lo menos el 25% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria.

Grado 4: Degenerado o muerto. Embriones degenerados, ovocitos o embriones de una célula, no viables.

Inmediatamente se completó la planilla de colecta y se enumeraron las pajuelas estériles de 0,25 ml de color amarillo translúcido, con el número de embrión y número de la donante, para proceder a cargar los embriones.

Las pajuelas se cargaron con la ayuda de una jeringa de 1ml, en el siguiente orden estricto, como se ejemplifica en la Figura 2.

- a. Aspiración de un pequeño volumen de medio (etilenglicol 1,5 M).
- b. Aspiración de una burbuja de aire.
- c. Aspiración de un pequeño volumen de medio (etilenglicol 1,5 M).
- d. Aspiración de una burbuja de aire.

- e. Aspiración de embrión con un pequeño volumen de medio (etilenglicol 1,5 M).
- f. Aspiración de una burbuja de aire.
- g. Aspiración de un pequeño volumen de medio (etilenglicol 1,5 M).
- h. Aspiración de una burbuja de aire.
- i. Aspiración de medio hasta llenar la pajuela.
- j. Una vez cargadas se sellaron con alcohol polivinílico.

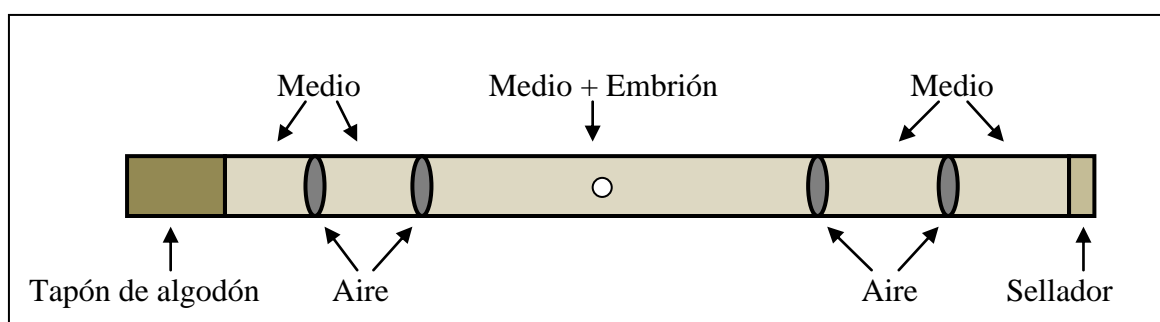


Figura 2. Método para cargar un embrión en una pajuela de 0,25 ml (Bó, 2012).

2.4. Criopreservación de embriones

Para el proceso de congelación de los embriones se utilizó etilenglicol, como medio crioprotector permeable de bajo peso molecular. Los embriones fueron cargados individualmente en las pajuelas de la manera descrita anteriormente.

Se cronometró el tiempo desde que los embriones entraron en contacto con el etilenglicol hasta el inicio de congelación, este tiempo no fue mayor de cinco minutos. Las pajuelas cargadas se colocaron en la congeladora (Freeze Control CL-5500, Cryologic), la cual mantenía una temperatura de -6°C . Se procedió a realizar el “seeding” que consiste en la inducción de la formación de cristales de hielo a partir de un punto, se efectuó tocando la

pajuela en la columna de medio superior al embrión con un hisopo previamente impregnado de nitrógeno líquido. La congeladora automáticamente realizó la curva de congelado, descendiendo la temperatura a 0,5°C/minuto hasta llegar a los -35°C. Una vez que finalizó el proceso de congelado, las pajuelas se pasaron a termos con nitrógeno líquido para su almacenamiento.

2.5. Etiquetado de pajuelas, visotubos y canisteres

El marcado de las pajuelas, visotubos y canisteres se realizó según el sistema estandarizado que recomienda la IETS con el fin de minimizar la confusión a la hora de identificar los embriones. En la Figura 3 se observa la forma de identificar cada embrión; dentro de una pajuela amarilla translúcida de 0,5 mm se colocó la siguiente información previamente impresa: número de pajuela, código de identificación del equipo de transferencia de embriones/técnico/establecimiento, código de la raza, número de registro de la hembra donante, código de la raza del padre, identificación del padre más registro oficial, fecha de congelación. En la Figura 4, se ilustra la identificación de los visotubos amarillos con el código del establecimiento, código de la raza, identificación de la madre, código de la raza del padre, identificación del padre, fecha de congelado y el número de embriones depositados en cada canister.

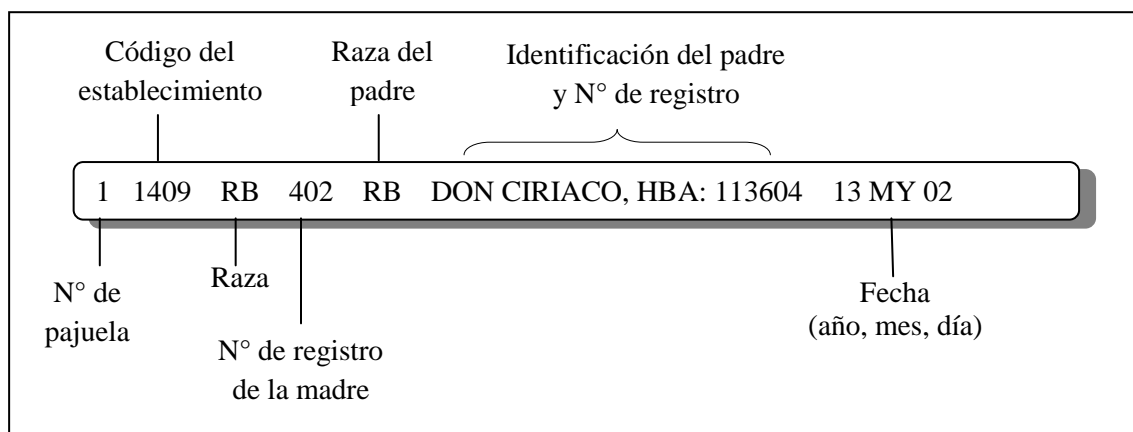


Figura 3. Identificación de un embrión dentro de la pajuela.

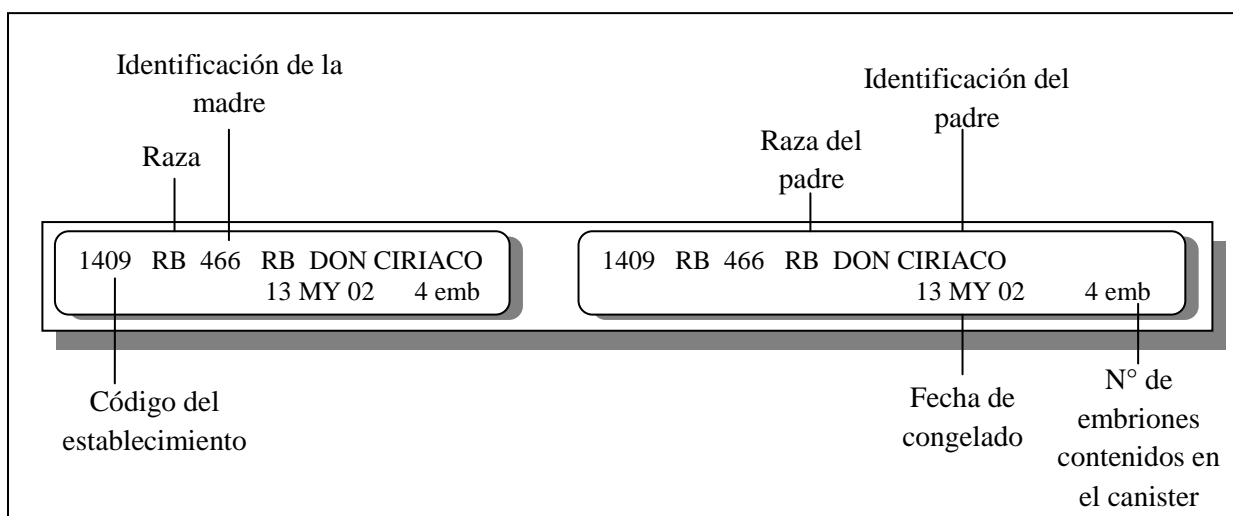


Figura 4. Identificación de visotubos y canisteres. Para almacenar y transportar embriones.

2.6. Sincronización de receptoras de embriones

El protocolo de sincronización expuesto en la Figura 5, consistió en la inserción de un dispositivo intravaginal de progesterona (DIB® 1 g progesterona Syntex S.A), en conjunto con la administración intramuscular de 2 mg de BE (Gonadiol 1mg/ml, Syntex S.A) en el día

0. El día 5 se aplicaron 500 μ g de PGF cloprostenol (Ciclase DL 250 μ g/ml, Syntex S.A) y 400 UI de eCG (Novormon, Syntex S.A). La remoción del dispositivo intravaginal DIB® se realizó el día 8.

El día 9 se inyectó vía i.m 1 mg de BE. No se detectó celo y la transferencia se realizó el día 17 (Baruselli et al, 2001). Se sincronizaron un total de 212 vacas de carne ciclando (británicas y cruce indicas), con una condición corporal de 2,5 a 3,5 (escala 1-5) y edad de tres a cinco años.

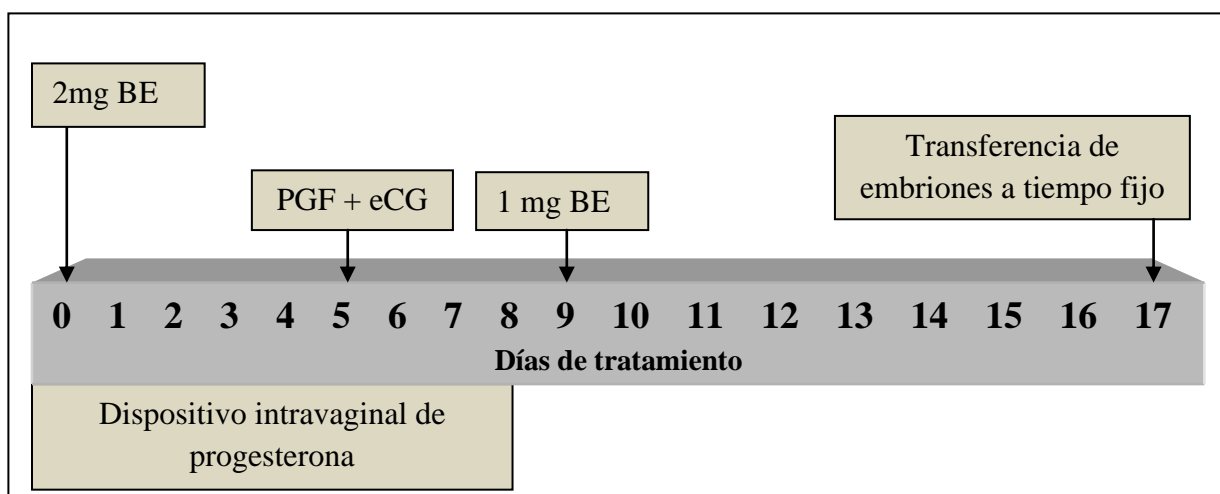


Figura 5. Protocolo de sincronización para TETF utilizado en receptoras de embriones bovinos producidos *in vivo*.

2.7. Técnica de transferencia de embriones

A todas las vacas receptoras se les realizó ecografía con el fin de evaluar el tamaño y la ubicación del cuerpo lúteo; las vacas que presentaron un CL mayor a 16 cm (grado 1) recibieron un embrión. Seguidamente se colocó anestesia epidural utilizando 5 ml de lidocaína al 2%.

Se procedió a lavar con agua y secar con papel toalla la región perineal y vulva. El cérvix se sujetó a través del recto, mientras que el pistoleta que contenía el embrión se introdujo por la vagina hacia el canal cervical y se direccionó al cuerno ipsilateral del CL. El embrión fue depositado aproximadamente en la mitad del cuerno uterino.

Las pajuelas de embriones congelados fueron extraídas del termo de nitrógeno líquido una por una, para ser descongeladas durante 15 a 30 segundos en agua a 30°C utilizando un descongelador electrónico de pajuelas (laboratorios Peyte, Industria Argentina), las pajuelas se ensamblaron en pistoletes metálicos de 60 cm de longitud, para ser transferidos. Se transfirieron un total de 168 embriones congelados grado 1 y 2 de la raza Brangus.

3. RESULTADOS

3.1. Respuesta al tratamiento de superovulación en vacas donantes de embriones

Se evaluó la respuesta de los tratamientos de superovulación analizando el número promedio de embriones totales colectados, fertilizados y congelados por hembra donante de las razas Brangus, Braford y Aberdeen Angus. Los resultados se resumen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Respuesta superovulatoria ($X \pm DS$) de donantes de embriones bovinos de las razas Brangus, Braford y Aberdeen Angus.

Raza	n	Ovocitos/ Embriones Totales	Embriones fertilizados	Embriones congelados
Brangus	24	16,7 (\pm) 9,5	10,5 (\pm) 7,7	8,5 (\pm) 6,9
Braford	18	14,2 (\pm) 11,0	3,0 (\pm) 4,6	2,0 (\pm) 3,3
Aberdeen Angus	3	16 (\pm) 9,3	4,7 (\pm) 3,9	2,7 (\pm) 1,2

Se obtuvo un porcentaje de vacas con nula respuesta al tratamiento superovulatorio, es decir, cero embriones aptos para congelar; del total de vacas tratadas y divididas según la raza: Brangus 29,2% y Braford 66,7%.

3.2. Clasificación embrionaria

Los embriones en estadios de desarrollo 4, 5 y 6, correspondientes a mórula, blastocisto temprano y blastocisto; grado de calidad 1 y 2, se seleccionaron como aptos para ser congelados.

En el Cuadro 3 se muestran los porcentajes de embriones de calidad 1 y 2 obtenidos. Y la tasa de embriones aptos para congelar, del total de embriones fertilizados obtenidos; con base en su estadio de desarrollo y calidad.

Cuadro 3. Porcentaje de embriones grado 1 y 2 del promedio de embriones congelados por vaca donante y porcentaje de embriones en estadios de desarrollo 4, 5 y 6.

Raza	Tasa embriones congelados/fertilizados	Grado 1	Grado 2
Brangus	8,5/10,5 (81,0%)	7,0/8,5 (82,4%)	1,5/8,5 (17,6%)
Braford	2,0/3,0 (66,7%)	1,6/2,0 (80,0%)	0,4/2,0 (20,0%)
Aberdeen Angus	2,7/4,7 (57,4%)	2,0/2,7 (74,1%)	0,7/2,7 (25,9%)
Todas las razas	13,2/18,2 (72,5%)	10,6/13,2 (80,3%)	2,6/13,2 (19,7%)

3.3. Tasa de aprovechamiento y tasa de preñez en vacas receptoras de embriones

La tasa de aprovechamiento se define como el número de vacas transferidas sobre el total de vacas tratadas y la tasa de preñez es el número de vacas preñadas sobre el total transferidas. En este programa de transferencia de embriones a tiempo fijo se obtuvo una tasa de aprovechamiento del 79,24%; y una tasa de preñez de 47,62%, a los 30 días de gestación.

4. DISCUSIÓN

Los casos expuestos y discutidos a continuación son el resultado de los distintos trabajos realizados durante la pasantía, no se realizó control de las variables que estarían involucradas en los resultados finales, por ejemplo: padre donador, inseminador, persona que realizó la colecta, encargado de la transferencia, estadio de desarrollo y calidad del embrión.

De las colectas realizadas, la raza Brangus obtuvo en promedio el mayor número de ovocitos/embriones totales ($16,7 \pm 9,5$), seguido por la raza Aberdeen Angus ($16 \pm 9,3$) y por último las Braford ($14,2 \pm 11,0$); estos valores evidencian la respuesta al tratamiento superovulatorio con Folltropin®-V.

Resultados de otros trabajos a campo con animales de carne indican que se pueden obtener respuestas satisfactorias con dosis totales de 200 a 260 mg en razas sintéticas como el Brangus y Braford (Bó, 2012). En este caso se obtuvo una buena respuesta en Brangus utilizando una dosis total de 200 mg de Folltropin®-V por animal.

Lo que comprueba que la dosis necesaria para lograr una respuesta satisfactoria se relaciona con el efecto de la raza. Bó y colaboradores en su estudio en el 2006, utilizaron una dosis total de 360 mg de Folltropin®-V en vacas Angus y 320 mg en vacas Brangus; a pesar de aplicar una dosis menor en las últimas, encontró un efecto significativo ($p < 0,001$) de la raza sobre el número de ovulaciones (Angus: $14,0 \pm 1,0$ vs Brangus: $22,0 \pm 1,8$).

Tomando en cuenta resultados obtenidos de estudios anteriores, es posible estimar la respuesta superovulatoria de donantes de embriones bovinos. Para la cual una respuesta satisfactoria sería obtener un promedio de $12,1 \pm 0,9$ embriones totales y $6,3 \pm 0,6$ embriones transferibles

por vaca donante de embriones en razas de carne (Bó et al, 2002; Bó y Mapletoft, 2003). En este caso se obtuvo una respuesta satisfactoria promedio únicamente en la raza Brangus ($8,5 \pm 6,9$); y se obtuvo una pobre respuesta al tratamiento en las razas Braford ($2,0 \pm 3,3$) y Aberdeen Angus ($2,7 \pm 1,2$).

Los valores altos de DS obtenidos (Cuadro 2) demuestran que existió una gran varianza entre los animales colectados; por ejemplo, una donante muy buena produjo 24 embriones aptos para congelar, mientras otras vacas tuvieron una respuesta de cero embriones fertilizados. Situación que influye directamente en el número promedio de embriones colectados según la raza.

La variabilidad individual es un factor siempre presente y no controlable en los tratamientos para inducir superovulación. Moor y colaboradores (1984), demostraron que tanto la tasa de ovulación como el número de embriones viables producidos son caracteres relativamente inherentes a cada vaca donante. En un programa de transferencia de embriones los animales que tienen una respuesta baja en un tratamiento, es muy probable que respondan en forma similar en los tratamientos subsecuentes y los animales que responden bien inicialmente continuarán haciéndolo en esta forma (Bó y Mapletoft, 2003).

Las vacas con mala respuesta en la primera fecha de colecta efectivamente continuaron respondiendo de manera similar en las siguientes fechas, tal es el caso del 66,7% de las vacas Braford. Estos resultados no se evaluaron en correlación con la variable del semen, el cual es un factor que afecta el resultado de embriones colectados; por ejemplo, si se utiliza semen de baja fertilidad posiblemente se obtenga un bajo número de embriones colectados por animal. Otro factor a tomar en cuenta es el estrés causado por el manejo durante los días de

tratamiento, puesto que se ha reportado que ocasiona una disminución en la respuesta superovulatoria (Stoebel y Moberg, 1982; Edwards et al., 1987; Bó et al., 1991).

Las vacas problema se caracterizan por tener una baja producción y calidad de embriones junto con un alto número de folículos anovulatorios. Evaluando la respuesta al tratamiento superovulatorio se obtuvo un 29,2% en la raza Brangus y 66,7% en Braford, de vacas con nula respuesta al tratamiento, es decir, cero embriones aptos para congelar, de las cuales el 84,2% obtuvieron además cero embriones fertilizados. Una solución para intentar mejorar la producción de embriones en estas vacas problema que tienen una pobre respuesta por tratamiento de superovulación, consiste en adicionar la aplicación de eCG al tratamiento con FSH.

Caccia y colaboradores en el 2000, demostraron que la administración de 500 UI de eCG dos días antes de iniciar los tratamientos con FSH tienden a incrementar la respuesta superovulatoria, posiblemente por el reclutamiento de mayor cantidad de folículos que ingresen dentro del pool de folículos de tres a cinco milímetros de la onda.

Carballo y colaboradores (2007), obtuvieron un aumento en la producción de embriones de vacas con historia de baja respuesta superovulatoria (≤ 3 embriones transferibles por tratamiento), cuando se incluyó eCG en el tratamiento las vacas produjeron $3,6 \pm 0,6$ embriones transferibles contra $1,0 \pm 0,2$ embriones transferibles cuando no se utilizó eCG.

Uno de los factores que afecta los porcentajes de preñez con embriones congelados es la calidad y el estadio de desarrollo del embrión. Según las normas de la IETS, los porcentajes de preñez son mayores cuando se congelan embriones grado 1 (excelentes y buenos). Stroud y Leibo (1995) estimaron el desempeño de cada uno de los estadios de desarrollo en la

congelación de embriones y determinaron que una respuesta muy buena se obtiene al congelar estadios 4, 5 y 6 con grado de calidad 1; estadios 4, 5 y 6 con grado de calidad 2, generan una respuesta de buena a regular; los estadios 3 y 7 tienen una respuesta variable y en general el grado de calidad 3 tiene malos resultados.

Es de esperarse que los grados 1 y 2 tengan mejores resultados, debido a sus características de mejor calidad, tales como: integridad de la zona pelúcida y menores irregularidades, pueden resistir mejor el proceso de congelación y descongelación. La tasa de embriones congelados/fertilizados (Cuadro 3) muestra que el 72,5% de los embriones totales fertilizados corresponden a los estadios de desarrollo 4, 5 y 6, seleccionados como aptos para congelar, esto se debe a que en el protocolo de tratamiento superovulatorio, la colecta de embriones se realiza siete días después de la primera IA, por lo que se espera que el mayor número de embriones colectados se encuentren en los estadios de desarrollo de mórula a blastocisto. Se obtuvo además un alto porcentaje de embriones grado 1 (80,3%), y por consiguiente se esperaría que al utilizar embriones de calidad excelente y buena, se obtenga un mayor porcentaje de preñez.

La congelación de embriones ha facilitado y optimizado la utilización de los programas de transferencia de embriones a campo, además de ser una excelente herramienta para el comercio internacional de genética. La criopreservación de embriones con etilenglicol tiene la clara ventaja de permitir la transferencia directa sin la necesidad de retirar el crioprotector después del descongelado y sin afectar la tasa de preñez (Bó, 2012). Mapletoft y Leibo (1999) transfirieron más de 19 000 embriones congelados con etilenglicol y alcanzaron una tasa de

preñez del 58%; porcentaje similar al obtenido con técnicas de dilución regulares cuando se usa glicerol como medio crioprotector.

En cuanto al porcentaje de preñez de las vacas receptoras de embriones, este puede variar del 35 al 65%, con embriones frescos se puede conseguir alrededor del 60% de preñez y 40 a 50% con embriones congelados. Adicionalmente se estima que aproximadamente el 84% del total de vacas tratadas sean aptas para transferir (Bó, 2012). En este caso se obtuvo una tasa de aprovechamiento aceptable del 79,2%; la finalidad del protocolo de sincronización es que se obtenga la mayor cantidad de receptoras aptas para recibir un embrión. Factores como manejo y apearse estrictamente el horario del protocolo establecido incrementaran el éxito de la sincronización.

En los programas de TEFT realizados durante la pasantía se obtuvo una tasa de preñez aceptable de 47,6%. Factores de manejo como nutrición e intervalo entre partos pueden determinar el éxito o fracaso de un programa de sincronización de celos y consecuentemente afectar la tasa de preñez; la iniciación de los ciclos estrales después del parto se demora si la vaca pierde peso durante la preñez y cuando las vacas son alimentadas adecuadamente durante la preñez pero no ganan peso en el periodo parto-servicio presentarán celos pero tendrán tasas reducidas de preñez (Odde, 1990; Humbolt et al., 1996).

En un estudio a campo donde las receptoras fueron categorizadas según su CC en una escala de 1 a 5, se obtuvo una tasa de preñez significativamente más alta en las receptoras cuya condición corporal fue de 3 (Mapletoft et al., 1986). Por lo tanto, es importante evaluar el estado nutricional de las receptoras antes de incorporarlas a un programa de transferencia de embriones.

La sincronía de la donante-receptora es otro factor a tomar en cuenta, debido a que los embriones congelados son más exigentes que los frescos, se considera que para la obtención de buenos resultados no se debe superar las 24 horas de asincronismo, la edad de desarrollo del embrión debe coincidir con los días pos celo de la receptora con el fin de garantizar un ambiente uterino adecuado para recibir el embrión. Datos de transferencia de embriones en receptoras *Bos indicus* muestran que los porcentajes del preñez utilizando embriones congelados con etilenglicol varían en un rango de 44 a 61% en relación al estadio del embrión y al día pos celo de la receptora (Bó, 2012).

La superovulación es un tratamiento relativamente sencillo pero está influenciado por un gran número de factores. Es necesario tener un buen conocimiento de la fisiología reproductiva del bovino y todos los factores asociados a la superovulación para disminuir al máximo los riesgos. A pesar de tener todo en cuenta, un número de vacas, aproximadamente el 25% no responderá a la superovulación o no producirá embriones de calidad. Generalmente se dice que si tratamos cuatro vacas, una no responderá, una tendrá una muy buena respuesta y dos vacas tendrán una respuesta promedio (Bó, 2012).

5. CONCLUSIONES

1. La aplicación de tratamientos que controlan la dinámica folicular y la ovulación, ofrecen la ventaja de poder programar los protocolos de superovulación rápidamente, obviando la detección de celo y realizando IATF en las donantes de embriones. La utilización de protocolos con benzoato de estradiol, dispositivos intravaginales con progesterona y eCG en receptoras, pueden ser aplicados en programas de transferencia de embriones a tiempo fijo con éxito, maximizando el número de receptoras utilizadas, obteniendo tasas de preñez aceptables y sin la necesidad de detectar celo.
2. La producción de embriones fertilizados es esencial para el éxito del programa de colecta y transferencia; no obstante, la pericia del operador y la atención de todos los detalles de la técnica, juegan un papel muy importante para garantizar buenos resultados.
3. Al transferir embriones congelados se puede esperar un porcentaje de preñez de 40 a 50%, dependiendo de la calidad de los embriones transferidos, de la habilidad del operador, el estado del CL y de las receptoras; factores como nutrición y condición corporal de las receptoras, y la sincronía de celo donante-receptora se deben tomar en cuenta si se desean obtener buenos resultados.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G.P. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*. 41:19-24.
- Adams, G.T, L.F. Nasser, G.A. Bó, A. García, M.R. Del Campo & R.J. Mapletoft. 1994. Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. *Theriogenology* 42:1103-1113.
- Armstrong, D.T. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*. 39:7-24.
- Baruselli, P.S., M.F. Filho, C.M. Martins, L.F. Nasser, M.F. Nogueira, C.M. Barros & G.A. Bó. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 65:77-88.
- Baruselli, P.S., M.O. Marques, E.H. Madureira, W.P. Costa Neto, R.R. Grandinetti & G.A. Bó. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. *Theriogenology*. 55: 157.
- Baruselli, P.S., C.M. Martínez, M.F. Sá Filho, L.F. Nasser, L.U. Gimenes, E.H. Madureira & G.A. Bó. 2005. Novos avanços nos tratamentos de doadoras e receptoras de embrião bovino. *Sociedade Brasileira de tecnologia de embriões*. 33:151-156.
- Beal, W.B. 1999. Practical application of ultrasound in bovine embryo transfer. p. 66-77. In 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA.

- Beal, W.E & R.H. Hinshaw. 2001. Synchronization of estrus and ovulation in bovine embryo transfer recipients. Proceedings of the Advanced Embryo Transfer Seminar 12. Annual Meeting of the American Association of Bovine Practitioners. Vancouver, BC, Can.
- Bergfelt, D.R., G.A. Bó, G.P. Adams, R.A. Pierson & R.J. Mapletoft. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 49:1-12.
- Bergfelt, D.R., K.C. Lightfoot & G.P. Adams. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*. 42:895-907.
- Bó, G.A, (ed). 2012. Especialidad en reproducción bovina: Transferencia de embriones y nuevas tecnologías. 1a. ed. Instituto de Reproducción Animal Córdoba - Universidad Nacional de Córdoba, Arg.
- Bó, G.A., G.P. Adams, M. Caccia, M. Martinez, R.A. Pierson, R.J. Mapletoft. 1995a. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci.* 39:193-204.
- Bó, G.A., G.P. Adams, R.A. Pierson, & R.J. Mapletoft. 1995b. Exogenous control of follicular development in cattle. *Theriogenology*. 43:31-40.
- Bó, G.A., G.P. Adams, R.A. Pierson & R.J. Mapletoft. 1996. Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*. 45:897-910.

- Bó, G.A., P.S. Baruselli, P.M. Chesta & C.M. Martins. 2006a. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*. 65:89-101.
- Bó, G.A., P.S. Baruselli, D. Moreno, L. Cutaia, M. Caccia, R. Tribulo, H. Tribulo & R.J. Mapletoft. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57:53-72.
- Bó, G.A. & M. Caccia. 2002. Dinámica folicular en el bovino. p. 55-58. *In* R. Ungerfeld, (ed). Reproducción en los animales domésticos. Tomo I. 1ª. Ed. Montevideo, Uru.
- Bó, G.A., M.G. Colazo, M.F. Martínez, J.P. Kastelic & R.J. Mapletoft. 2006b. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestágenos y diferentes esteres de estradiol. p. 71-84. *In* Biotecnologia da reprodução em bovinos, II simpósio internacional de reprodução animal aplicada. Oct. 05-07. Londrina, Bra.
- Bó, G.A., L. Cutaia & R. Tribulo. 2002a. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en argentina. Primera Parte. *Taurus*. 14:10-21.
- Bó, G.A., L. Cutaia & R. Tribulo. 2002b. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en argentina. Segunda Parte. *Taurus*. 15:17-32.
- Bó, G.A., D.K. Hockley, H. Tríbulo, F. Jofre, R. Tríbulo, N. Busso, A.D. Barth & R.J. Mapletoft. 1991. The effect of dose schedule and route administration on superovulatory responses to Folltropin in the cow. *Theriogenology*. 35:186.

- Bó, G.A. & R.J. Mapletoft. 2003. Superovulación en bovinos. p. 515-538. *In* R. Ungerfeld, (ed.). Reproducción en los animales domésticos. Tomo II. 1^a. ed. Melibea, Montevideo, Uru.
- Bó, G.A., H. Tribulo, M. Caccia & R. Tribulo. 1998. Superovulatory response of beef heifers treated with estradil benzoate, progesterone and CIDR-B vaginal devices. *Theriogenology*. 49:375.
- Caccia, M. 2003. Control de la dinámica folicular y producción de embriones bovinos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Caccia, M., R. Tríbulo, H. Tríbulo & G.A. Bó. 2000. Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology*. 53:495
- Carballo, D.M. 2012. Superovulación en la primera onda folicular. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba, Arg.
- Carballo, D.M., A. Tríbulo, R. Tríbulo, E. Balla, H. Tríbulo & P. Chesta. 2007. Efecto de la aplicación de eCG dos días previos al inicio de la superestimulación en donantes de embriones con antecedentes de baja respuesta a los tratamientos tradicionales. p. 289. *In* VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Jun.29- Jul.1. Córdoba, Arg.
- Chupin, D., Y. Combarous & R. Procureur. 1984. Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. *Theriogenology*. 21: 229.

- Colazo, M.G., J.P. Kastelic, J.A. Small, R.E. Wilde, R.D. Ward & R.J. Mapletoft. 2007. Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. *Can. Vet. J.* 48: 49-56.
- Edwards, L.M., C.H. Rahe, J.L. Griffin, D.F. Wolfe, D.N. Marple & K.A. Cummins. 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology*. 28:291-299.
- Ginther, O.J., J.P. Kastelic & L. Knopf. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two or three follicular wave. *J. Reprod Fertil.* 87:223-230.
- González, A., J.G. Lussier, T.D. Carruthers, B.D. Murphy & R.J. Mapletoft. 1990. Superovulation of beef heifers with Follitropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*. 33: 519- 529.
- Hahn, J. 1992. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*. 38:269-275.
- Humbolt, P., B. Grimard & J.P. Mialot. 1996. Sources of variation of post partum cyclicity, ovulation and pregnancy rates in suckled beef cows treated with progestagen and PMSG. p. 36-45. *Proc. Soc. Theriogenology Meeting. Kansas City, USA.*
- Kim, H.I., D.S. Son, H. Yeon, S.H. Choi, S.B. Park, I.S. Ryu, G.H. Suh, D.W. Lee, C.S. Lee, H.J. Lee & J.T. Yoon. 2001. Effect of dominant follicle removal before

- superovulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*. 55:937-945.
- Land, R.B. & W.G. Hill. 1975. The possible use of superovulation and embryo transfer in cattle to increase response to selection. *Anim. Prod.* 21:1-2.
- Lindsell, C.E., B.D. Murphy & R.J. Mapletoft. 1986. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*. 26:209-219.
- Lohouis, M.M., C. Smith & J.C. Dekkers. 1993. Results from a dispersed hybrid nucleus programme in dairy cattle. *Anim. Prod.* 57:369-378.
- Looney, C.R. 1986. Superovulation in beef females. p. 16-29. *In Proceedings 5th Annual Convention*. AETA. Fort Worth, Tx, USA.
- Mapletoft, R.J., G.A. Bó & G.P. Adams. 2000. Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. *Archivo de la Facultad de Veterinaria UFRGS, Porto Alegre*. 28: 23-48.
- Mapletoft, R.J., M.G. Colazo, M.F. Martinez, J.P. Kastelic. 2003. Esteres de estrógeno para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con dispositivos con progesterona. p. 55-67. *In V Simposio Internacional de Reproducción Animal*. Jun. 27-29. IRAC. Huerta grande, Córdoba, Arg.
- Mapletoft, R.J. & J.F. Hasler. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech. of. Int. Epiz.* 24: 393-403.

- Mapletoft, R.J. & S.P. Leibo. 1999. Criopreservación de embriones y el uso de la transferencia directa. p. 159-168. *In* III Simposio Internacional de Reproducción Animal. Jun. 19-21. Villa Carlos Paz, Córdoba, Arg.
- Mapletoft, R.J., C.E. Lindsell & V. Pawlyshyn. 1986. Effects of clenbuterol, body condition and non-surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients. *Theriogenology*. 25:172.
- Mapletoft, R.J. & R.A. Pierson. 1993. Factors affecting superovulation in the cows: practical considerations. *IETS Embryo Transfer Newsletter*. 11:14-24.
- Martinez, M.F., G.P. Adams, D.R. Bergfelt, J.P. Kastelic & R.J. Mapletoft. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci*. 57:24-33.
- Moor, R.M., Kruip, T. & D. Green. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation. *Theriogenology*. 21:103-116.
- Moreno, D., L. Cutaia, H. Tríbulo, R. Tríbulo, M. Caccia & G.A. Bó. 2001a. Efecto de la adición de una dosis de eCG en tratamientos de sincronización de la ovulación con DIB y estradiol en receptoras de embriones. p. 267. *In* IV simposio internacional de reproducción animal. Jun. 22-24. Huerta grande, Córdoba, Arg.
- Moreno, D., L. Cutaia, M.L. Villata, F. Ortisi & G. Bó. 2001b. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*. 55:408.

- Nasser, L.F., G.P. Adams, G.A. Bó & R.J. Mapletoft. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*. 40:713-724.
- Nasser, L.F., E.L. Reis, M.A. Oliveira, G.A. Bó & P.S. Baruselli. 2004. Comparison of four synchronization for fixed time bovine embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients. *Theriogenology*, 62:577-584.
- Ochoa, J.C., R.A. Ramírez, M.B. Piccardi, G.A. Bó & R. Tribulo. 2009. Influencia de la estación en la producción de embriones en donantes de embriones de raza para carne. p. 352-353. In VIII Simposio Internacional de Reproducción Bovina. Set. 26, 27 y 28. IRAC. Córdoba, Arg.
- Odde, K.G. 1990. A review of synchronization of estrus in post partum cattle. *J. Anim. Sci.* 68:817-830.
- Pursley, J.R., M.O. Mee & M.C. Wiltbank. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. *Theriogenology*. 44:915-923.
- Stoebel, D.P. & G.P. Moberg. 1982. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 65:92-99.
- Stringfellow, D.A. & S.M. Siedel. 2000. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). 3ª. ed. Illinois, USA.

- Stroud, B. 2012. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report. IETS Newsletter. 30:16-26.
- Stroud, B. & J.F. Hasler. 2006. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*. 65:65-76.
- Stroud, B. & S.P. Leibo. 1995. A consumer's guide to frozen embryos. *The Beefmaster Cowman*. March:48-80.
- Thatcher, W.W., K.L. Macmillan, P.J. Hansen & M. Drost. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*. 31:149-164.
- Thibier, M. 2003. More than half a million bovine embryos transferred in 2002: a report of the IETS Data Retrieval Committee. *IETS Newsletter*. 21:12-19.
- Thibier, M. 2006. Transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. *IETS Newsletter*. 24:12-18.
- Tríbulo, R., M. Nigro, E. Burry, M. Caccia & G.A. Bó. 1997. Pregnancy rates in recipients receiving CIDR-B devices immediately following embryo transfer. *Theriogenology*. 47:372.

Wock, J.M., L.M. Lyle & M.E. Hockett. 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.

7. ANEXOS

Anexo 1. Planilla protocolo de superovulación (Bó, 2012).

PROTOCOLO DE SUPEROVULACION

Donante:

RP:raza:CC:

Tratamiento:

Status ovárico Día 0:

OD: _____ OI: _____

Droga SPO:

Marca: Follitropin-V

ml tot.: 10ml

DIA	FECHA	HORA	TRATAMIENTO	Follitropin-V	
0	Martes 14/05/2013		dipositivo + 2.5mg BE + 50mg de P4		
4	Sabado 18/05/2013	8:00 hs		2ml	
		20:00 hs		2ml	
5	Domingo 19/05/2013	8:00 hs		1.5ml	
		20:00 hs		1.5ml	
6	Lunes 20/05/2013	8:00 hs	2 ml de PGF	1ml	
		20:00 hs	2 ml de PGF	1ml	
7	Martes 21/05/2013	8:00 hs	Retirar Dispositivo	0.5ml	
		20:00 hs		0.5ml	
8	Miercoles 22/05/2013	8:00 hs	GnRH		
		20:00 hs	IA 1		
9	Jueves 23/05/2013	8:00 hs	IA 2		
15	Miercoles 29/05/2013		COLECTA DE EMBRIONES		

CELO

fecha: _____

día: _____

hora: _____

IA

Toro: _____

	fecha/hora	dosis	observaciones
1 era:	_____	_____	_____
2 da:	_____	_____	_____

Anexo 2. Planilla de colección de embriones (Bó, 2012).

INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL CÓRDOBA

AÑO _____

DOSIS TOTAL: _____ mL Folltropin-V

DONANTE Nombre: _____ H.B./ _____

RP: _____ Raza: _____ Propietari _____

SERVICIO Nombre: _____ H.B. _____

RP: _____ Raza: _____ Fech _____

COLECCIÓN Fecha: _____ Hora: _____ Operario: _____

CL: OD: _____	Ol: _____	N° Ova/Emb: _____	1° Lavado +	2° Lavado =	Total
Fol: OD: _____	Ol: _____	N° Emb Fertilizados: _____	+	=	_____
		N° Emb Infertilizados: _____	+	=	_____

Clasificación de	Totales	7	6	5	4	3
		Bex	B	eB	M	Mt
Calidad 1: Buenos y Excelent						
Calidad 2: Regulares						
Calidad 3: Malos						
Calidad 4: Degenerados						

CONGELADO Tiempo desde colección: _____ Temperatura ambiente _____

CONGELACIÓN						TRANSFERENCIA					
RACK	Paj.	Est.	Cal	Medio	Tiemp	Fecha	Receptora	Op	Calif	Lugar	Observaciones
	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	10										
	11										
	12										
	13										
	14										
	15										
	16										
	17										
	18										
	19										
	20										

Hora finalizacion: _____

COMENTARIOS:

Anexo 3. Protocolo de sincronizacion de receptoras (Bó, 2012).

ESTABLECIMIENTO:

PROPIETARIO:

Protocolo sincronizacion de receptoras

Hora de inicio:

Fecha:

Hora final:

DIA	FECHA	HORA	TRATAMIENTO
0		AM	Disp + EB 2ml
5		AM	PG 2ml + Novormon 2ml
8		AM	Retiro disp
9		AM	1 ml EB
10		AM	Celo
17		AM	TE

