



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EFECTO DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE
EMBRIONES BOVINOS EN RESPUESTA A DOS
PROTOCOLOS PARA SUPEROVULACIÓN**

AUTOR: VACA CARRILLO MARCO ANTONIO

DIRECTOR: VALDIVIESO PLAZA FÉLIX

SANTO DOMINGO

2017

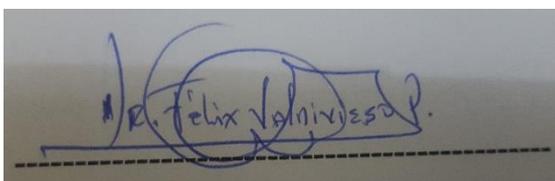


DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“EFECTO DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE EMBRIONES BOVINOS EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS PARA SUPEROVULACIÓN”** realizado por el señor Egresado **MARCO ANTONIO VACA CARRILLO**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo que cumple con los requisitos teóricos, técnicos, científicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a el señor **MARCO ANTONIO VACA CARRILLO** para que sustente públicamente el mencionado tema.

Santo Domingo, Febrero del 2017



DR. FÉLIX VALDIVIESO PLAZA
DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **MARCO ANTONIO VACA CARRILLO**, con cédula de identidad N° 1716304462 declaro que este trabajo de titulación ***“EFECTO DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE EMBRIONES BOVINOS EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS PARA SUPEROVULACIÓN”*** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Santo Domingo, Febrero del 2017

A handwritten signature in blue ink is shown on a white background. The signature is stylized and appears to read 'Marco Antonio Vaca Carrillo'. Below the signature, there is a horizontal dashed line.

MARCO ANTONIO VACA CARRILLO

C.C. 1716304462



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, **MARCO ANTONIO VACA CARRILLO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación ***“EFECTO DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE EMBRIONES BOVINOS EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS PARA SUPEROVULACIÓN”*** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Santo Domingo, Febrero del 2017

A handwritten signature in blue ink is shown on a grey background. The signature is stylized and appears to read 'Marco Antonio Vaca Carrillo'. Below the signature, there is a horizontal dashed line.

MARCO ANTONIO VACA CARRILLO

C.C. 1716304462

DEDICATORIA

A mi amado Dios por darme la fortaleza, sabiduría, paciencia y ganas de seguir adelante en este camino hacia la ingeniería.

A mi único padre Marco Antonio Carrillo Meza quien me apoyada en toda mi vida y ha sabido cumplir este papel a carta cabal.

A mis mamas Rosy Carrillo y Fanny Muñoz quienes han forjado en mí grandes valores y gracias a ellas he podido culminar este arduo camino académico.

A Madelin que fue un gran apoyo con comprensión y amor.

Gracias mil.

Marco Antonio Vaca Carrillo.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme fuerzas durante toda la carrera y en especial en el desarrollo de la tesis.

A toda mi familia por darme apoyo incondicional en todo momento.

A mi querida Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE – IASA II por darme la oportunidad ser parte de tan gran Institución Educativa.

A mi querido Director de tesis que más que Director y Docente es mi gran amigo el Doctor Félix Valdivieso Plaza.

Al Doctor Gelacio Gómez y el Ingeniero Andrés Vargas por su gran ayuda durante todo el desarrollo del proyecto.

A mi compañera y amiga Valery por su gran comprensión y apoyo en nuestra investigación.

A mis grandes amigos Renato Verdezoto y Santiago Bustos por esa amistad totalmente desinteresada.

Marco Antonio Vaca Carrillo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA	I
CERTIFICACIÓN	II
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	III
AUTORIZACIÓN	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
ÍNDICE DE CONTENIDO	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	1
CAPÍTULO I.....	2
PROBLEMA	2
1.1 Planteamiento del problema	2
1.2 Antecedentes	2
1.3 Justificación	2
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo General	4
1.4.2 Objetivos Específicos.....	4
1.5 Hipótesis.....	4

CAPÍTULO II	5
2.1 Introducción	5
2.2 Ciclo Reproductivo (Ciclo Estral)	6
2.3 Superovulación	8
2.3.1 Factores que intervienen en la respuesta superovulatoria	8
2.3.2 Hormonas usadas para superovulación	9
2.4 Embriones en ganado bovino	9
2.4.1 Desarrollo embrionario	10
2.4.1.1 Nomenclatura	11
2.4.2 Calidad embrionaria	12
2.4.2.1 Criterios de calidad embrionaria	13
2.5 Criopreservación de embriones bovinos	13
2.5.1 Métodos de criopreservación	14
2.5.2 Factores que afectan la criopreservación y almacenamiento de embriones	14
 CAPÍTULO III	 16
 3 MATERIALES Y METODOLOGÍA	 16
3.1 Ubicación del lugar de la investigación	16
3.1.1 Ubicación política	16
3.1.2 Ubicación geográfica	16
3.1.3 Ubicación ecológica	16
3.2 Materiales	16
3.2.1 Material experimental	16
3.2.2 Material complementario	16
3.2.2.1 Material para la sincronización de celo, superovulación e inseminación artificial (I.A).	16
Papel toalla	17
3.2.2.2 Materiales para la recolección de embriones	17
3.2.2.3 Materiales para la evaluación de embriones	18
3.2.2.4 Materiales para la criopreservación de embriones	18
3.2.2.5 Materiales para esterilización, higiene y limpieza	18
3.2.2.6 Equipos extra	18

3.3	Métodos	19
3.3.1	Diseño experimental	19
3.3.1.1	Factores	19
3.3.1.2	Análisis estadístico	19
3.3.1.3	Esquema del diseño experimental	19
3.3.1.4	Variables medidas	20
3.3.1.4.1	Número de embriones	20
3.3.1.4.2	Grados de calidad de los embriones	20
3.3.1.4.3	Estado de desarrollo de los embriones	21
3.3.2	Métodos específicos del manejo del experimento	21
3.3.2.1	Preparación de donantes	21
3.3.2.2	Aplicación de protocolos de superovulación	22
3.3.2.3	Recolección de embriones	25
3.3.2.4	Evaluación de la calidad de los embriones	28
3.3.2.5	Criopreservación de los embriones	28
CAPÍTULO IV		30
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	30
4.1	Número de embriones colectados	30
4.2	Grados de calidad y estado de desarrollo de los embriones	31
4.3	Costo de producción por vaca "donante lavada"	34
4.4	Valor por embrión viable colectado	34
CAPÍTULO V		37
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
5.1	Conclusiones	37
5.2	Recomendaciones	37
5.3	Bibliografía	39

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 CALIDAD DE EMBRIONES.....	20
TABLA 2. ESTADO DE DESARROLLO	21
TABLA 3. PROTOCOLO 1.....	23
TABLA 4. PROTOCOLO 2.....	24
TABLA 5. PROMEDIO \pm ERROR ESTÁNDAR DEL N° DE EMBRIONES DE DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN	30
TABLA 6. NÚMERO DE EMBRIONES POR VACA OBTENIDOS EN CADA PROTOCOLO	31
TABLA 7. GRADOS DE CALIDAD EMBRIONARIA EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN.....	32
TABLA 8. ESTADIO EMBRIONARIO EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN.....	32
TABLA 9. EFECTO DEL ESTADIO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN	33
TABLA 10. COSTO DE PRODUCCIÓN POR DONADORA LAVADA	34
TABLA 11. COSTO DE PRODUCCIÓN POR EMBRIÓN COLECTADO EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN	35
TABLA 12. COSTO DE PRODUCCIÓN POR VACA SUPEROVULADA EN EL PROTOCOLO 1	35
TABLA 13. COSTO DE PRODUCCIÓN POR VACA SUPEROVULADA EN EL PROTOCOLO 2	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 FASES DEL CICLO ESTRAL 1	8
FIGURA 2 SUPEROVULACIÓN VS. CICLO ESTRAL REGULAR	8
FIGURA 3 DESARROLLO Y TRÁNSITO EMBRIONARIO EN EL TRACTO GENITAL.....	11
FIGURA 4 ESTADIOS EMBRIONARIOS	12
FIGURA 5 TIPOS DE COMPUESTOS CRIOPROTECTORES, CARACTERÍSTICAS Y EJEMPLOS	15
FIGURA 6 MODELO DE ESQUEMA PARA LOS TRATAMIENTOS 1 Y 2..	19
FIGURA 7 ESQUEMA DE CATÉTER FOLLEY UBICADO EN EL ÚTERO DE LA DONANTE	26
FIGURA 8 ESQUEMA DEL CIRCUITO CERRADO CON FLUJO CONTINUO	27
FIGURA 9 PROCEDIMIENTO DE BÚSQUEDA DE EMBRIONES.....	27
FIGURA 10 ESQUEMA DEL LLENADO DE LA PAJUELA CON UN EMBRIÓN CONGELADO.....	28
FIGURA 11 CURVA DE CONGELACIÓN PARA EMBRIONES BOVINOS .	29
FIGURA 12 NÚMERO TOTAL DE EMBRIONES COLECTADOS EN CADA	31
FIGURA 13 ESTADIO EMBRIONARIO EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN.....	33

RESUMEN

Determinar la calidad y cantidad embrionaria, en respuesta a dos protocolos de superovulación en ganado bovino es una investigación que se la realizó en la Hda. Zoila Luz propiedad de la Universidad de Las Fuerza Armadas, los protocolos de superovulación se los realizó con el uso de FSH-p, en 6 vacas donantes de la raza Gyr y Girolando; se utilizó una “Prueba t pareada” con 2 tratamientos estos son (T1: protocolo 1 con dosis de 200 mg de FSH-p y T2: protocolo 2 con dosis de 180 mg de FSH-p), el manejo previo a las donadoras con una correcta alimentación, chequeos ginecológicos y aplicación de minerales. Las variables que se consideraron fueron: número de embriones, grados de calidad de embriones, estado de desarrollo de los embriones y costos; dichos embriones fueron colectados en el día séptimo mediante lavado uterino. En cuanto a los resultados no presentaron diferencias estadísticamente a excepción de los grados de calidad embrionaria. No obstante un análisis cuantitativo refleja que los valores más altos para número de embriones se presentaron con el tratamiento T1 (33 embriones), versus el tratamiento T2 (17 embriones). En el parámetro de grados de calidad y estadio embrionario también el tratamiento T1, fue el mejor obteniendo 11 embriones de grado I y 8 embriones de grado II; así como también el tratamiento T1 en costos de producción por embrión colectado tiene un valor de (\$141,48) mientras que el T2 tiene un valor de (\$185,95), así el T1 es el tratamiento económicamente más viable.

PALABRAS CLAVE:

- **EMBRIONES**
- **COSTOS**
- **SUPEROVULACIÓN**

ABSTRACT

To determine the quality and quantity of embryonic, in response to protocols of superovulation in cattle is an investigation that was performed in the Hda. Zoila Luz, owned by the University of the Armed Forces, supernovation protocols are performed using FSH-p in 6 Gyr and Girolando donor vacancies; (T1: protocol 1 with 200 mg dose of FSH-p and T2: protocol 2 with 180 mg dose of FSH-p), previous management to the donors A correct feeding, gynecological checkups and application of minerals. The variables considered were: number of embryos, degrees of embryo quality, state of development of embryos and costs; These embryos were collected on the seventh day by uterine lavage. Regarding the results, there was no statistically significant difference in the embryonic grade. However a quantitative analysis reflected that the highest values for the number of embryos are presented with T1 treatment (33 embryos), versus T2 treatment (17 embryos). In the parameter of degrees of quality and embryonic stage also T1 treatment was the best obtaining 11 embryos of degree I and 8 embryos of degree II; As well as the T1 treatment in production costs per embryo collected has a value of (\$ 141.48) while T2 has a value of (\$ 185.95), thus T1 is the most economically viable treatment.

KEYWORDS:

- **EMBRYOS**
- **COSTS**
- **SUPEROVULATION**

CAPÍTULO I

PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

A nivel país todavía se ve el tema de superovulación y transferencia de embriones como una técnica de reproducción poco utilizada y muy costosa, de escasos resultados positivos, sin embargo las respuestas que se pueden llegar a tener usando protocolos estandarizados de superovulación son muy buenos ya que el objetivo es multiplicar las vacas de alto mérito genético del ható y por ende tener mayor producción y productividad.

1.2 Antecedentes

Las nuevas técnicas de reproducción bovina se han venido desarrollando desde hace tiempo en el país de forma localizada, por ejemplo en la zona sierra del país específicamente en la Provincia de Pichincha se cuenta con varias haciendas que ya aplican estas técnicas de reproducción con resultados aceptables cosa que no sucede en la zona costa y amazonia donde son mínimas las haciendas que trabajan aplicando estas biotecnologías reproductivas.

La relación a nivel país que existe entre habitantes y UBA es de un tercio lo cual refleja según Teófilo Carvajal, representante de la Federación de Ganaderos del Ecuador (Fedegan), que es una proporción muy baja cuando lo idóneo es un bovino por cada habitante; Esto conlleva a que se debe emplear biotécnicas de reproducción bovina eficaces para poder suplir este desfase. (FEDEGAN, 2015)

1.3 Justificación

Un estudio realizado por la Subsecretaría de Fomento Agroproductivo demuestra que las tecnologías a nivel de finca en cuanto a producción

ganadera es básicamente de carácter extensivo es decir que el incremento de la producción se ha basado en la incorporación de más unidades de factor, principalmente pastizales y número de cabezas, más no en un mejoramiento de los rendimientos por unidad de factor, lo cual se evidencia en los bajos rendimientos tanto en producción de leche como en carne. (OÑATE, 2003)

En base a un estudio realizado por el Proyecto para la Reorientación del Sector Agropecuario (PRSA), para determinar los niveles tecnológicos de las UPAs del Ecuador, en base al estudio de una muestra representativa compuesta por las provincias de Cañar, Guayas, Manabí y Pichincha se pudo observar que del total de unidades de producción bovina investigadas, el 3% utilizaban sistemas productivos tecnificados, un 10% estaban semitecnificados y un 87% estaban muy poco tecnificados. (OÑATE, 2003)

Actualmente el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), lleva a cabo el proyecto de “Programa de Repoblamiento y Mejoramiento Genético” el cual consiste en importar alrededor de 35000 reses principalmente de las razas Angus, Brangus y Brahaman procedentes de Paraguay y EEUU. Si bien es cierto estos animales son de excelentes características fenotípicamente y genotípicamente el impacto que van a sufrir al adaptarse al medio va hacer muy fuerte por lo que es muy posible que no expresen todo su potencial genético, por lo cual se presume que la tasa de morbilidad y mortalidad del ganado puede ser considerable (Pérez, 2015).

Se torna indispensable realizar investigaciones en el campo reproductivo bovino con el fin de afinar protocolos de superovulación y lograr tener un mejor resultado en cuanto al número de embriones colectados y calidad de los mismos. Dichos avances revolucionarán la industria ganadera a nivel de todo el país e influirán de manera positiva en la masificación del uso de biotecnologías embrionarias, lo cual evidentemente, permitirá mejorías genéticas en lapsos de tiempo más cortos dentro de los hatos bovinos (Mogollón & Burla, 2013).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de la calidad y cantidad de embriones bovinos en respuesta a dos protocolos de superovulación.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la calidad de los embriones bovinos obtenidos en cada protocolo de superovulación.
- Determinar el número de embriones bovinos obtenidos en cada protocolo.
- Determinar el costo de producción de cada embrión colectado.
- Compartir los resultados obtenidos en el proyecto de investigación con asociaciones ganaderas del país, estudiantes y persona a fin al campo ganadero.

1.5 Hipótesis

Ho: No existe diferencia en la calidad y cantidad embrionaria, sometiendo a semovientes donantes a diferentes protocolos de superovulación.

Hi: Existe diferencia en la calidad y cantidad embrionaria, sometiendo a semovientes donantes a diferentes protocolos de superovulación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

Las mejorías en la eficacia reproductiva y la proliferación de genotipos más rentables están directamente ligadas a incentivar la productividad, los cuales son factores determinantes para la sostenibilidad de la actividad pecuaria (Mogollón & Burla, 2013). En el área de la reproducción, se intenta destacar genéticamente las mejores características de los bovinos para incrementarlas en una ganadería (Calva, Cortés, Aja, Ortiz, & Cevenini, 2001), una ayuda importante para lograr este objetivo, es incursionar en los tratamientos de superovulación en vacas, con el propósito de generar un elevado número de embriones transferibles que resulten en una alta expectativa de preñez (Garzón, Urrego, & Giraldo, Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos, 2007).

Consecuencia de la superovulación se generarán embriones bovinos, de los cuales, su calidad será fundamental para establecer en un futuro un plan de transferencia de embriones (TE). Los embriones bovinos, destinados a un programa de TE pueden ser obtenidos mediante técnicas no quirúrgicas. Su selección y transferencia exitosa dependerán de varios factores como la resistencia de éstos para sobrevivir y la técnica de obtención (Palma, 1993).

La superovulación es el aumento del número fisiológico de ovulaciones propias de la especie, provocado por la administración de gonadotropinas exógenas o análogas de estas. En bovinos, se sabe que existió respuesta al tratamiento superovulatorio cuando se generan más de dos ovulaciones. El objetivo de los tratamientos de superovulación en vacas donantes es obtener el máximo número de ovulaciones y de embriones de buena calidad, para ser transferidos a vacas receptoras (Cabodevilla & Torquatri, 2001).

La eficiente respuesta al tratamiento superovulatorio es la condición fundamental para que un programa de transferencia de embriones tenga éxito, sin embargo, la gran variabilidad en la respuesta a los tratamientos hormonales puede ser influenciada por factores externos o factores fisiológicos (Mogollón & Burla, 2013).

2.2 Ciclo Reproductivo (Ciclo Estral)

El ciclo reproductivo o estral se compone de los eventos fisiológicos que se producen entre periodos iterativos de receptividad sexual y la ovulación se inicia después de la pubertad en las hembras para continuar durante toda su vida (Senger, 2003). Normalmente el ciclo reproductivo o estral varía entre 17-24 días, considerándose 21 días como el tiempo promedio del ciclo (Rippe, 2009). El ciclo reproductivo o estral consta de 3 fases:

- Fase folicular o de regresión del cuerpo lúteo (Proestro): es la fase de regresión del cuerpo lúteo (CL) y culmina con el inicio del estro o celo (Rippe, 2009), esta fase se considera corta, dura de 2-3 días (Senger, 2003).

La regresión del CL ocurre por intervención de la prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) de origen uterino (Rippe, 2009).

Durante la fase folicular ya existe un folículo dominante que llegara a tener un tamaño de $\frac{3}{4}$ a 1 pulgada con una apariencia de una ampolla llena de líquido, varios folículos podrían llegar a desarrollarse durante el proceso de dinámica folicular pero solo 1 será el folículo dominante escogido para iniciar con la ovulación. Este folículo dominante se diferencia de los demás en que es estimulado coordinadamente por las hormonas FSH y LH para producir estrógenos, el aumento en los niveles de estrógenos del folículo preovulatorio llegan a los centros nerviosos del hipotálamo que comandan la sintomatología externa de celo, a partir de ese momento inicia la fase del estro (Rippe, 2009).

- Fase periovulatoria (Estro y Metaestro): el **estro** es el período caracterizado de actividad y receptividad sexual en el cual el principal signo es que el animal permanece en pie y quieto al ser montado por otro (Senger, 2003), además se visualizan otros signos como, inquietud, inflamación de la vulva, secreción de moco (claro y transparente) que sale por la vulva, el olor del moco es atractiva y excitante para el macho debido a las feromonas presentes (Shearer, 2003). Los signos de estro ocurren gracias a la presencia de los estrógenos provenientes del folículo (Rippe, 2009). El aumento de LH comienza una vez visualizan los primeros signos de celo y se origina el proceso de ovulación (Lucy, 2006). La LH y FSH son vistas como las responsables de la ovulación,

además la FSH contribuye a la formación de tejido luteal (Rippe, 2009). De 12 a 24 horas desde el inicio del celo, el sistema nervioso central del animal se vuelve indiferente a los estrógenos y las demostraciones de celo desaparecen (Rippe, 2009).

Concluido el celo comienza el **metaestro** consistente en la ovulación y formación de un CL funcional, esta fase dura entre 3 a 5 días (Senger, 2003). Durante el metaestro se produce la ovulación entre 28 a 32 horas después de haberse iniciado el celo, o entre 10 a 15 horas de haber finalizado los síntomas de celo en respuesta al pico preovulatorio de LH (Rippe, 2009). Después de la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre, volviéndose en una estructura llamada cuerpo hemorrágico (Rippe, 2009). A continuación se produce la luteinización de las células foliculares que se convierten en células luteales; estos cambios ocurren entre el día 5 a 7 del ciclo, concluyendo la etapa de metaestro e iniciándose la etapa lútea o diestro (Rippe, 2009).

- Fase Luteal (Diestro): La estructura dominante es el CL y la hormona reproductiva principal es la progesterona (Rippe, 2009). La fase lútea es más extensa que la fase folicular y, en la mayoría de los mamíferos, ocupa alrededor del 80% del ciclo estral (Senger, 2003). Esta etapa va desde el día 5 del ciclo estral hasta el día 18 (Rippe, 2009). Los niveles de progesterona más altos se alcanzan alrededor del día 10 del ciclo estral y se mantienen hasta el día 16 o 18 del ciclo dependiendo de la presencia o no de un embrión. Si la vaca está preñada, el CL se mantiene, los niveles de progesterona son altos y se bloquea la reaparición del celo (Rippe, 2009).

En resumen (ver Figura 1):

- Proestro: Formación de folículos ovulatorios + secreción de estrógenos.
- Estro: receptividad sexual + pico de secreción de estrógenos.
- Metaestro: formación de CL + inicio de secreción de progesterona.
- Diestro: secreción prolongada de progesterona.

(Senger, 2003)

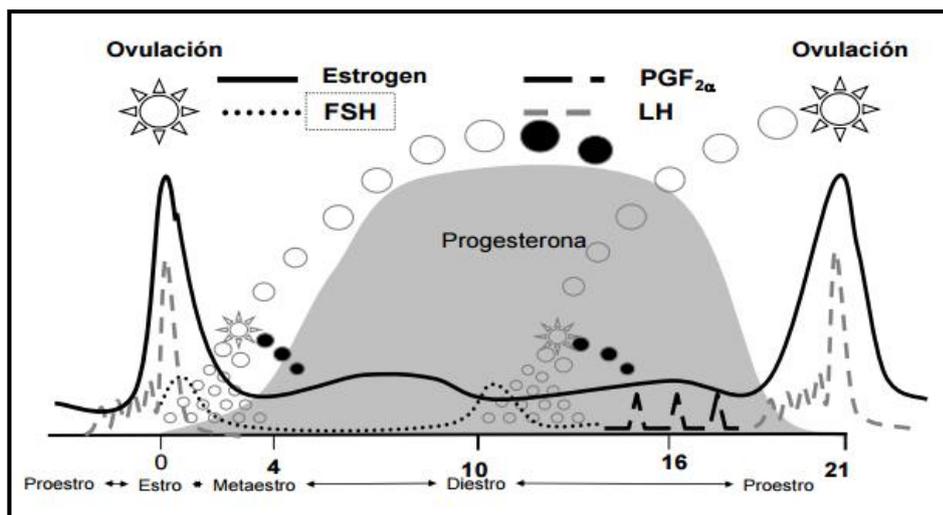


Figura 1 Fases del Ciclo Estral 1

Fuente: (Rippe, 2009)

2.3 Superovulación

El objetivo principal de la superovulación es provocar el desarrollo folicular en cada ciclo estral (Garzón, Urrego, & Giraldo), por lo tanto se dice que la superovulación es el incremento del número fisiológico de ovulaciones típico de una especie, generado mediante la administración de gonadotrofinas exógenas (ver Figura 2); se sabe que hubo respuesta al tratamiento cuando se producen más de dos ovulaciones (Cabodevilla & Torquatri, 2001).

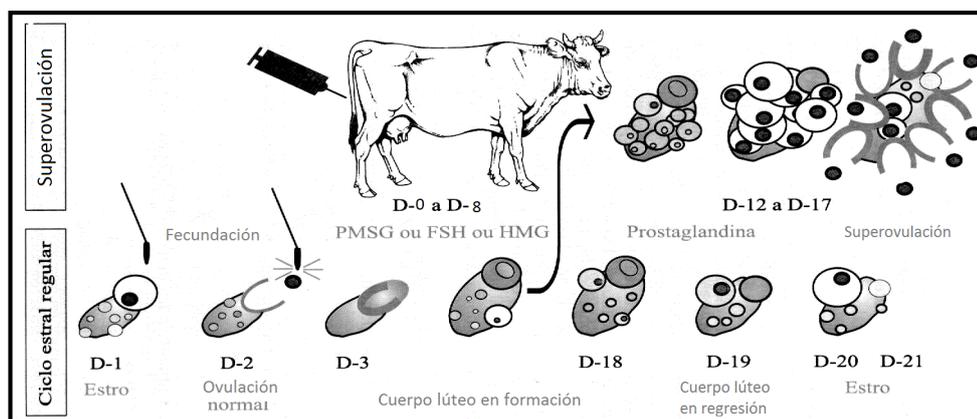


Figura 2 Superovulación vs. Ciclo estral regular

Fuente: (Guido, 2005)

2.3.1 Factores que intervienen en la respuesta superovulatoria

En un programa de superovulación están involucrados varios procesos, dentro de los cuales se encuentran:

- Factores externos: Como el periodo o estación del año, nutrición, manejo y calidad del semen pueden afectar la superovulación de una manera directa o indirecta. También se debe tomar en cuenta el momento de la inseminación (Jiménez, 2009).
- Factores fisiológicos: se ha indicado que la especie, raza, edad, número de partos, estado lactacional, fertilidad de la vaca, el estado sanitario, crecimiento folicular y características de las ondas foliculares así como , dosis y frecuencia de administración de hormonas (Jiménez, 2009).

2.3.2 Hormonas usadas para superovulación

Se han usado tres tipos de gonadotrofinas exógenas diferentes para inducir la superovulación en donantes bovinas: extractos de pituitaria de animales domésticos, gonadotrofina coriónica equina (eCG o PMSG), y gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Becaluba, 2007).

- Extractos de pituitaria: Son los más utilizados, entre los que tenemos a la hormona folículo estimulante (FSH), proveniente de extractos de pituitaria de porcinos, ovinos, equinos y bovinos (Mogollón & Burla, 2013). Debido a la vida media de la FSH (entre 5 a 12 horas), es preciso usar dosis intramusculares más frecuentes para lograr la superovulación en las hembras bovinas (Mogollón & Burla, 2013).
- Gonadotrofina coriónica equina (eCG): Es una hormona compleja con actividad FSH y LH, esta hormona posee una vida media aproximada de 40 horas en bovinos y puede persistir por más de 10 días en la circulación sanguínea (Becaluba, 2007).
- Gonadotrofina coriónica humana (hCG): Su uso principal es en humanos debido a su alto costo a nivel veterinario. Posee la misma cantidad de FSH que de LH y los tratamientos son aplicaciones por vía intramuscular cada 12 horas en dosis decrecientes por 4 a 5 días (Becaluba, 2007).

2.4 Embriones en ganado bovino

Un embrión es resultado de la fusión de dos células gaméticas (óvulo y espermatozoide) de una especie, para posteriormente mediante sucesivas divisiones mitóticas pasar por varios estadios que van desde mórula a blastocisto. Los embriones en producción animal tiene diferentes tipos de aplicaciones, desde aquellas en que está destinada a su uso en programas

de mejoramiento genético hasta el aumento de la eficiencia individual de una especie, como es el caso de su utilización para la producción de mellizos en bovinos (Alberio, 1999).

2.4.1 Desarrollo embrionario

Un embrión es una célula de 150-190 μm de diámetro (Linder & Wright, 1983), incluyendo a la zona pelúcida y una capa acelular formado por glicoproteínas (Noden & Lahunta, 1985). Horas después de la fusión gamética se produce una célula llamada cigoto, que aproximadamente al día dos post fecundación comienza a dividirse. La división es mitótica y dichas células que se forman son llamadas blastómeros. El desarrollo del embrión hasta los 8 días ocurre dentro de la zona pelúcida (Palma, 1993).

En condiciones naturales, el embrión que se formó sigue el desarrollo mencionado anteriormente (ver Figura 3). Sin embargo, en la superovulación los óvulos, en muchos casos, no son expulsados al mismo tiempo, sino que esto se da en intervalos de tiempo de hasta 24 horas después del pico de LH (Linder & Wright, 1983), prolongándose la ovulación hasta 33 horas después del mismo (Callensen, Greve, & Hyttel, 1986).

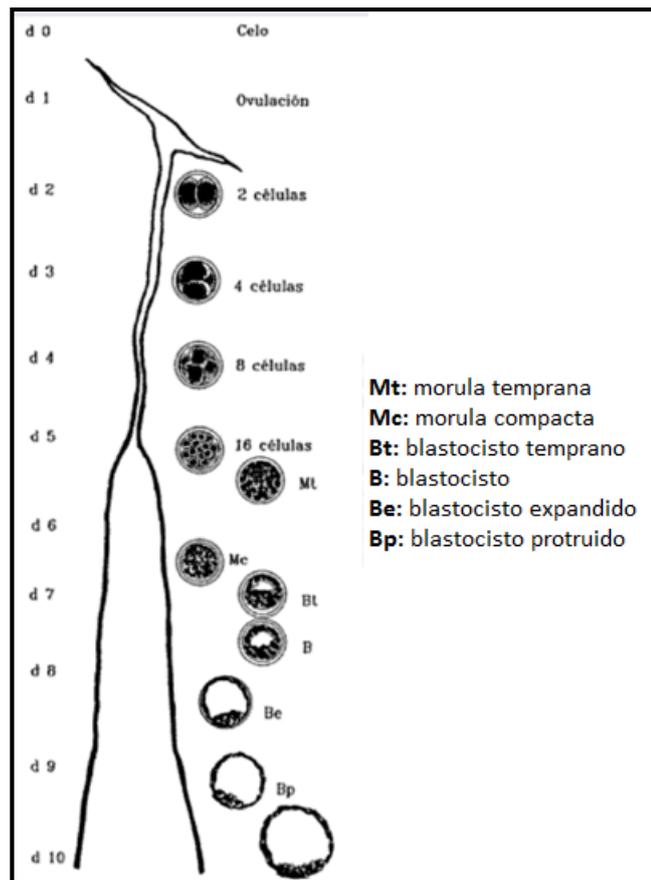


Figura 3 Desarrollo y tránsito embrionario en el tracto genital
Fuente: (Palma, 1993)

Por lo tanto los embriones que se obtienen de una vaca donante pueden estar en diferentes estadios de su desarrollo (desde mórulas a blastocitos) (Palma, 1993).

2.4.1.1 Nomenclatura

Mórula temprana (Mt): Día 5 post fecundación. Hasta 32 blastómeros que se pueden distinguir individualmente, su forma es similar a la de una mora. La masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino (ver Figura 4) (Palma, 1993).

Mórula (M): Día 5-6 post fecundación. Pueden observarse desde 32-64 blastómeros que están unidos y forman una masa compacta que indica diferenciación embrionaria (ver Figura 4) (Pedersen, 1988).

Blastocisto temprano (Bt): Día 7 post fecundación. Desarrollo de 100-200 blastómeros. Se caracteriza por la formación de una cavidad llamada

blastocelo en el interior del embrión y es posible diferenciar el trofoblasto del macizo celular interno (ver Figura 4) (Leibo, 1985).

Blastocisto (B): Día 7-8 post fecundación, 100-200 blastómeros. Se diferencia fácilmente las células del trofoblasto, que se adosa a la zona pelúcida y el macizo celular interno se nota más oscura (ver Figura 4) (Palma, 1993).

Blastocisto expandido (Be): Día 7-8 post fecundación, más de 200 blastómeros. Los embriones experimentan una pérdida completa o parcial del blastocelo. Se produce la ruptura de la zona pelúcida y comienza la protrusión del embrión (ver Figura 4) (Palma, 1993).

Blastocisto eclosionado (Bp): Día 8-9 post fecundación, 200-800 blastocistos. Los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica. Pueden ser transferidos, pero aquellos embriones desprovistos de la zona pelúcida pueden ser muy frágiles y pegajosos (ver Figura 4) (Palma, 1993).

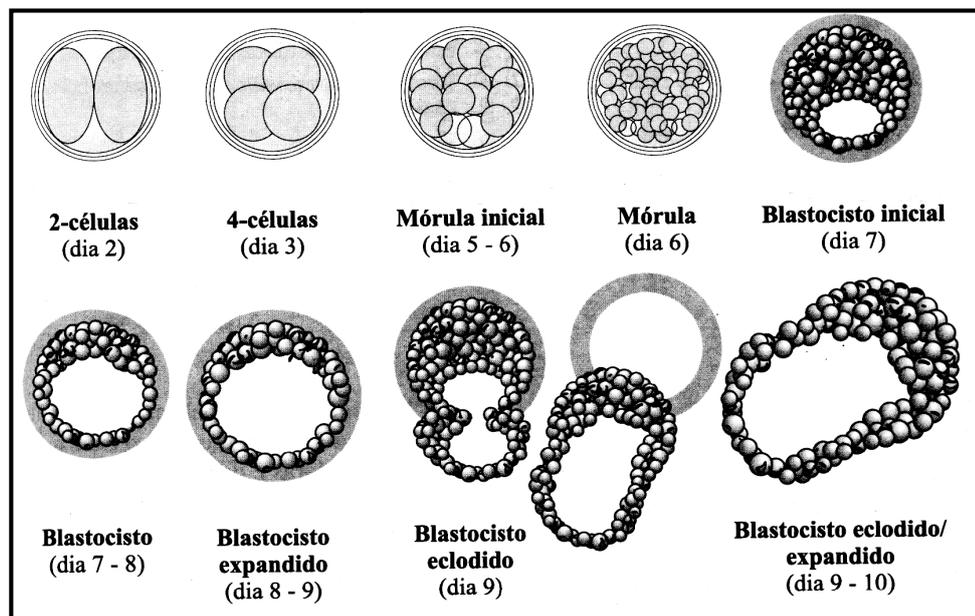


Figura 4 Estadios embrionarios

Fuente: (Rippe, 2009)

2.4.2 Calidad embrionaria

La evaluación de la calidad embrionaria deberá ser minuciosa, ya que de ellos depende el éxito de la transferencia embrionaria. Aquellos embriones de

clasificados como grado I o excelentes y grado II o buenos, tienen un 60% de probabilidad de lograr la preñez (Cutini, Turuel, & Cabodevilla, 2000).

Actualmente se utiliza la una escala propuesta por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) que agrupa los embriones según su calidad en 4 grados: excelentes, buenos, regulares, malos (descritos en la sección 3.3.1.5.3.) (Cutini, Turuel, & Cabodevilla, 2000).

2.4.2.1 Criterios de calidad embrionaria

Se consideran los siguientes criterios sobre las estructuras y cualidades de un embrión de excelente calidad:

- Forma esferoide del embrión.
- Homogeneidad de los blastómeros.
- Tonalidad uniforme de los embriones.
- Homogeneidad de la membrana celular.
- Espacios proporcionales entre el embrión y espacio perivitelino.
- Zona pelúcida intacta.
- Carencia de detritus celulares y mucosidades adosadas a la zona pelúcida.
- Compactación o agrupación de los blastómeros entre sí.

(Palma, 1993)

2.5 Criopreservación de embriones bovinos

La criopreservación es una de las técnicas que contribuye al incremento de la productividad animal, pues permite la preservación (Dobrinsky, 2002) y funcionalidad de las células a bajas temperaturas, que van desde los -80° y -196°C (Ávila, y otros, 2006), por lo tanto, es posible incrementar el número de crías por hembra a lo largo de su vida reproductiva (Vásquez, Cueva, Cordero, Gonzales, & Huanca, 2011).

Ninguna técnica de criopreservación garantiza una total eficacia. A pesar de esto, la criopreservación protege a las células de los principales efectos perjudiciales del proceso en si, como la formación de hielo intracelular, deshidratación de las células embrionarias y efectos tóxicos de los crioprotectores (Dobrinsky, 1996).

2.5.1 Métodos de criopreservación

En la criopreservación de embriones se habla de dos métodos, el método de congelación tradicional (congelación lenta) y el método no equilibrado (enfriamiento muy rápido y vitrificación) (Vásquez, Cueva, Cordero, Gonzales, & Huanca, 2011). A continuación se describen los métodos de criopreservación:

- Congelación convencional (congelación lenta): Los crioprotectores utilizados en este método son permeables y los más utilizados son: glicerol y etilenglicol (Portal veterinario Albéitar, 2003). Descrita en la sección 3.3.2.5
- Vitrificación: Conserva los tejidos y células en lo posible sin formación de cristales de hielo mediante elevadas concentraciones de crioprotectores y altas velocidades de enfriamiento (Portal veterinario Albéitar, 2003). La alta velocidad de cambios de temperatura ofrece dos ventajas:
 - Disminuye el tiempo de contacto entre el embrión y los efectos tóxicos de los crioprotectores (Portal veterinario Albéitar, 2003).
 - Reduce el riesgo de lesiones en el embrión por la exposición a bajas temperaturas pues el paso por la zona de "temperatura crítica" es rápida (Portal veterinario Albéitar, 2003).

En general, las mejores técnicas apuntan a la utilización del sistema basado en la vitrificación, con concentraciones muy elevadas del crioprotector (Etilenglicol hasta 5,5 o 6 M), equilibración a temperatura ambiente, enfriamiento súper rápido en vapores de nitrógeno e introducción en nitrógeno líquido (Portal veterinario Albéitar, 2003).

2.5.2 Factores que afectan la criopreservación y almacenamiento de embriones

En muchos de los casos el éxito o fracaso de la criopreservación y almacenamiento dependen de los varios factores o la combinación de uno o varios de ellos (Brackett, Seidel, & Seidel, 1981).

A continuación se describen algunas de ellas:

- Tipo y concentración de los componentes: Los componentes utilizados usualmente se dividen en dos grupos (ver Figura 5):
 - Intracelulares que penetran y protegen a la células (glicerol, dimetil sulfoxido y etilenglicol) (Roa, Linares, & Tamasaukas, 1998).
 - Extracelulares que no penetran a las células (sacarosa, polivinilpirrolidona, hidroxietil almidón HES, dextrano, albúmina), (Roa, Linares, & Tamasaukas, 1998).

Tipos	Características	Ejemplos
Intracelulares	<ul style="list-style-type: none"> -Son de bajo peso molecular -Son permeables al embrión 	<ul style="list-style-type: none"> -Glicerol -DMSO -Etilenglicol -Propilenglicol
Extracelulares	<ul style="list-style-type: none"> - Son de alto peso molecular (son azúcares y proteínas) -Son impermeables al embrión 	<ul style="list-style-type: none"> -Sucrosa -Seroalbumina bovina -Ácido hialurónico -Polivinilpirrolidona(PVP) -Hidrosietilo de almidón (HES) -Dextranos -1,2 propanadiol (PROH) -Glucoproteínas de peces del antártico (congelan a -2.5°C)

Figura 5 Tipos de compuestos crioprotectores, características y ejemplos

Fuente: (Roa, Linares, & Tamasaukas, 1998)

- Formacion de hielo: No deberá formarse en el crioprotector, sino hasta que la temperatura disminuya a su punto de congelacion correspondiente (Roa, Linares, & Tamasaukas, 1998).
- Tasa de enfriamiento: La tasa de enfriamiento, ya sea rápida o lenta, debe garantizar la supervivencia de las células a la congelación y descongelación (Mazur, 1966).
- Temperatura de almacenamiento: La forma más segura es introduciendo las células en nitrógeno líquido (-196°C) o en vapor de nitrógeno líquido (-150°C) (Roa, Linares, & Tamasaukas, 1998).
- Tasa de descongelacion: Embriones rehidratados de forma muy baja y rápida, mueren más facilmente (Roa, Linares, & Tamasaukas, 1998) y aparentemente si la rehidratación es muy baja y rápida, el embrión muere (Córdova, y otros, 2015).

CAPÍTULO III

3 MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del lugar de la investigación

3.1.1 Ubicación política

El presente proyecto de investigación la fase de campo como la de laboratorio se lo realizó en las instalaciones de la Carrera de Ingeniería Agropecuarias IASA II – Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicada en la Hacienda Zoila Luz km 24 vía Santo Domingo-Quevedo. Parroquia: Luz de América. Cantón: Santo Domingo de los Colorados. Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas.

3.1.2 Ubicación geográfica

La Hacienda Zoila Luz se encuentra a una altitud de 270 m.s.n.m. en las coordenadas UTM 9954241 Este, 688477 Norte.

3.1.3 Ubicación ecológica

- Zona de vida: Bosque Húmedo Tropical (Bht) (Holdridge, 1987).
- Formación Ecológica: Bosque Siempreverde Piemontano (Sierra, 1999)
- Características climáticas
 - Temperatura media anual: 23.6°C
 - Precipitación media anual: 2980 mm/año
 - Heliofanía media anual: 660 h/luz/año
 - Humedad relativa: 91%

3.2 Materiales

3.2.1 Material experimental

Se utilizó vacas elites de la raza Gyr y Girolando que son las que se adaptan de mejor manera a la zona costera del país.

3.2.2 Material complementario

3.2.2.1 Material para la sincronización de celo, superovulación e inseminación artificial (I.A).

- Hormonas (PGF_{2α}, Progestágeno, Benzoato de estradiol, FSH-p, GnRH)

- Pajuelas con semen de reproductor raza Holstein y Gyr
- Jeringuillas desechables de 5 ml
- Agujas hipodérmicas de 18G y 21G
- Aplicador de implante
- Implante vaginal CIDR®
- Guantes obstétricos y ginecológicos desechables
- Pistola de Inseminación artificial
- Catéteres de I.A
- Termómetro
- Termo descongelador de semen
- Chemise

Papel toalla

3.2.2.2 Materiales para la recolección de embriones

- Anestésico (Clorhidrato de lidocaína al 1%)
- Flunixin meglumina
- Hormona (PGF_{2α})
- Tijeras
- Alcohol etílico de 70°
- Papel toalla
- Jeringuillas desechables de 5 ml y 20 ml
- Agujas hipodérmicas de 18G y 21G
- Dilatador de cérvix
- Catéter folley de dos vías # 16 y 18
- Mandril de acero inoxidable
- Sondas adaptables a catéter folley
- Suero fisiológico fetal bovino (PBS + 1% de SFB), como solución de lavado
- Filtros para colectar embriones
- Botella para recolectar el exceso de suero fisiológico fetal bovino
- Lubricante Bovino

3.2.2.3 Materiales para la evaluación de embriones

- Equipos de laboratorio (Estéreo microscopio, Baño maría, Platina térmica)
- Cajas Petri cuadradas y de 4 pocillos
- Jeringa de 20 ml
- Agujas hipodérmicas de 18G
- Medio de conservación para embriones (Holding)
- Micro pipetas para embriones
- Puntas de 10 µl
- Papel toalla
- Alcohol etílico de 70°
- Cámara fotográfica

3.2.2.4 Materiales para la criopreservación de embriones

- Congelador de embriones con marcaje 20° a -43°C FREEZE CONTROL®; modelo CL-5500 SYSMTEM
- Medio de criopreservación para embriones (Etilenglicol)
- Medio de conservación para embriones (Holding)
- Pajuelas de plástico de 0.25 ml para embriones
- Sellador manual de pajuela
- Marcador para rotular
- Nitrógeno líquido
- Termo de crioconservación 20/20; marca I.M.B

3.2.2.5 Materiales para esterilización, higiene y limpieza

- Papel toalla
- Alcohol etílico de 70°
- Jabón desinfectante

3.2.2.6 Equipos extra

- Deshumificador marca EXCELL, modelo MDFE65AN1; UPS (estabiliza y mantiene energía), modelo PS5490.

3.3 Métodos

3.3.1 Diseño experimental

3.3.1.1 Factores

Se emplearon dos protocolos de superovulación en ganado bovino, para la evaluación de la cantidad y calidad embrionaria.

Tratamientos

Para el desarrollo del presente proyecto de investigación se utilizaron los siguientes tratamientos:

- T1: protocolo 1
- T2: protocolo 2

Se distribuyeron seis unidades experimentales que estaban conformadas por cada vaca donante en las que se probó ambos tratamientos.

Nota: Los protocolos 1 y 2 se encuentran descritos en la sección 3.3.2.2.

3.3.1.2 Análisis estadístico

Se aplicó una “Prueba t pareada”, con la finalidad de que, al culminar el ensayo, los dos tratamientos fueron aplicados a la misma unidad experimental (Muestras dependientes).

3.3.1.3 Esquema del diseño experimental

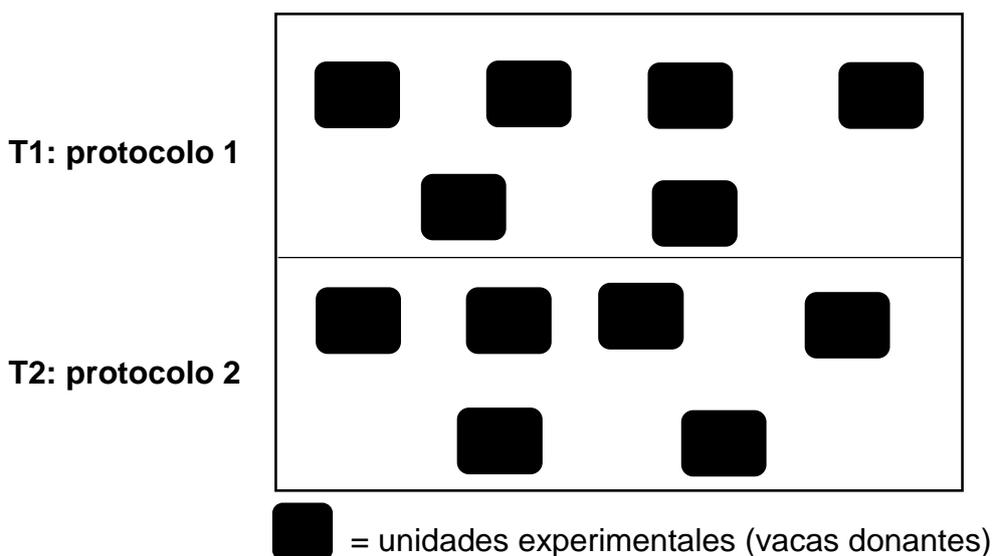


Figura 6 Modelo de esquema para los tratamientos 1 y 2

3.3.1.4 Variables medidas

3.3.1.4.1 Número de embriones

Una vez colectados los embriones de las reproductoras donantes, se procedió a contabilizar el número de embriones que se obtuvo por cada tratamiento.

3.3.1.4.2 Grados de calidad de los embriones

Los grados de calidad embrionaria se determinan mediante la observación a través del estereomicroscopio, se consideró tres parámetros fundamentales los cuales fueron; forma, color y multiplicación celular. Para este estudio se utilizó la escala propuesta por la IETS, que consta de 4 grados (Stingfellow & Siedel, 2000), que se describen a continuación:

Tabla 1 Calidad de embriones

Grados de calidad	Características
Excelente o Bueno (I)	No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniformes, simétricos, de forma esferoide y la zona pelúcida está intacta.
Regular (II)	El embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares, Su forma puede ser ligeramente irregular.
Malo (III)	El embrión posee varios defectos: detritus celulares, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida. <u>Esta categoría es considerada como no transferible, ni criopreservable.</u>
Muerto o Degenerándose (IV)	El embrión posee muchos defectos: los correspondientes al grado III más desarrollo retardado, seria ruptura de la zona pelúcida (el embrión puede encontrarse parcialmente fuera de ella), forma muy asimétrica, tendencia a la

desintegración como granulación o vacuolización de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y la clara degeneración. **Esta categoría es considerada como no transferible, ni criopreservable.**

Fuente: (Stingfellow & Siedel, 2000)

3.3.1.4.3 Estado de desarrollo de los embriones

El estado de desarrollo de los embriones se determinó por medio de la observación microscópica; además fueron codificados según la nomenclatura estipulado por la IETS (Stingfellow & Siedel, 2000).

Tabla 2. Estado de desarrollo

Código de estado	Estado
1	No fecundado
2	2 a 12 células
3	Mórula temprana
4	Mórula
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto eclosionado
9	Blastocisto eclosionado expandido

Fuente: (Stingfellow & Siedel, 2000)

3.3.2 Métodos específicos del manejo del experimento

3.3.2.1 Preparación de donantes

Para iniciar con el proyecto de Investigación se adquirió un lote de vacas de las razas Gyr y Girolando. Dichos animales cuentan con un programa sanitario riguroso a través de manejo sanitario, registros individuales y certificación de predio libre de brucelosis y tuberculosis.

Para la investigación se seleccionaron 6 reproductoras, el primer paso a seguir es determinar su estado reproductivo mediante ecografía.

La condición para que una reproductora sea aceptada en un programa de superovulación es que las donantes estén vacías y sin ternero al pie. Pueden estar en período de lactancia no menor a sesenta días.

A todas las donadoras se las sometió a un plan de desparasitación y vitaminas.

Se fijó también un proceso de adaptación de aproximadamente 60 días ya que los animales sufren un estrés al trasladarse de un lugar a otro y no van a responder de manera óptima a los protocolos de superovulación.

Durante el periodo de adaptación se realizó ecografías 3 veces por semana con el fin de observar el comportamiento y desarrollo folicular.

Para tener una mayor respuesta en la aplicación de los protocolos de superovulación se mejoró la alimentación de las donadoras, a través del suministro de sobrealimento.

3.3.2.2 Aplicación de protocolos de superovulación

Con Las donadoras adaptados y reproductivamente aptas se procedió a iniciar con el proceso de superovulación para lo cual se dividió en dos grupos de animales 3 donantes inician con el protocolo 1 y las otras 3 donantes inician con el protocolo 2.

Los protocolos que se utilizaron se encuentran descritos en la tabla 3 y 4.

Tabla 3. Protocolo 1

Día	Producto	Dosis	Hora	Vía de administración
0	Colocación de Implante CIDR®	1,38 g de progesterona		I.V
	Benzoato de estradiol	2 mg (2 ml)	En la mañana	I.M.
	Progesterona	50 mg (2 ml)		I.M.
4	FSH-p	40 mg (2 ml)	am	I.M.
	FSH-p	40 mg (2 ml)	pm	I.M.
			(intervalo de 12 h)	
5	FSH-p	30 mg (1,5 ml)	am	I.M.
	FSH-p	30 mg (1,5 ml)	pm	I.M.
6	FSH-p	20 mg (1 ml)	am	I.M.
	PGF _{2α}	50 mg (2 ml)	am	I.M.
	<u>Retiro del implante</u>			
	FSH-p	20 mg (1 ml)	pm	I.M.
7	PGF _{2α}	50 mg (2 ml)	pm	I.M.
	FSH-p	10 mg (0,5 ml)	am	I.M.
	FSH-p	10 mg (0,5 ml)	pm	I.M.
8	Presencia de celo			
	GnRH	1,5 ml	am	
	-	I.A	am	
	-	I.A	pm	-
	-	I.A	am	
	GnRH	1,5 ml	am	
15	Colecta de embriones, selección, envasado y crío preservación	-	-	-

I.V= Intravaginal

I.M= Intramuscular

Fuente: (Valdivieso, s/a)

Tabla 4. Protocolo 2

Día	Producto	Dosis	Hora	Vía de administración
0	Colocación de Implante CIDR®	1,38 g de progesterona		I.V
	Benzoato de estradiol	2 mg (2 ml)	En la mañana	I.M.
	Progesterona	50 mg (2 ml)		I.M.
4	FSH-p	40 mg (2 ml)	am	I.M.
	FSH-p	40 mg (2 ml)	pm	I.M.
			(intervalo de 12 h)	
5	FSH-p	30 mg (1,5 ml)	am	I.M.
	FSH-p	30 mg (1,5 ml)	pm	I.M.
6	FSH-p	20 mg (1 ml)	am	I.M.
	FSH-p	20 mg (1 ml)	pm	I.M.
7	PGF _{2α}	2 ml	am	I.M
	<u>Retiro del implante</u>			
	PGF _{2α}	2 ml	pm	I.M
Presencia de celo				
8	GnRH	1,5 ml	pm	I.M
	-	I.A	pm	-
	-	I.A	am	-
9	-	I.A	pm	-
	GnRH	1,5 ml	pm	I.M
16	Colecta de embriones, selección, envasado y crio preservación	-	-	-

I.V= Intravaginal

I.M= Intramuscular

Fuente: (Valdivieso, s/a)

3.3.2.3 Recolección de embriones

Al día séptimo post inseminación se realiza la colecta de los embriones, es de suma importancia que la donadora se encuentre en ayuno aproximadamente 12 horas con el fin de no tener exceso de fecas el momento del lavado, el brete debe estar lo más limpio posible para evitar cualesquier tipo de contaminación, la donadora debe estar muy tranquila sin estrés y evacuarle las fecas; farmacológicamente se aplica 3,5 ml de clorhidrato de lidocaína al 1% (anestésico vía epidural) y 5 ml de flunixin meglumina vía intramuscular como relajante y antiinflamatorio. Para la colecta de los embriones, se utilizó el sistema de circuito cerrado con flujo continuo (ver Figura 8).

Una vez anestesiada la donante se lava el área perianal; Se localiza el cérvix, seguidamente se dilata el mismo con la ayuda de un dilatador de cérvix via intravaginal. Cabe recalcar que este proceso debe ser lo más cuidadoso posible ya que la donadora al no estar en celo no existe el moco lubricador interno por lo que se vuelve frágil a ser perforado el cérvix. Con el cérvix dilatado se introduce el catéter folley con la ayuda del mandril para que dicho catéter tenga rigidez, se fija el catéter en el cuerno de la donadora aproximadamente 1/3 y se retira el mandril, luego se recarga con aire de 12 a 15 ml, formando un balón en el extremo del catéter folley (ver Figura 7).

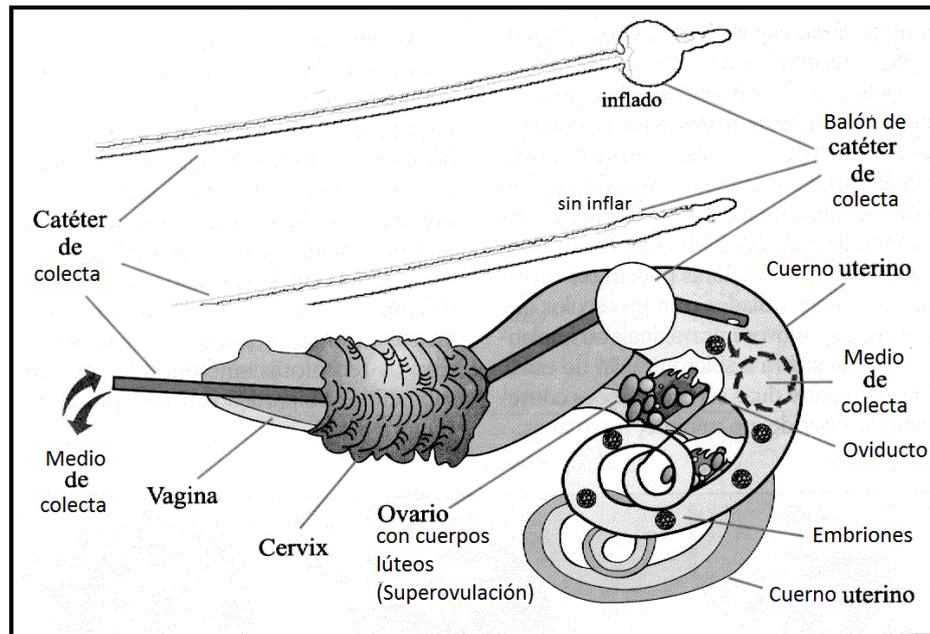


Figura 7 Esquema de catéter folley ubicado en el útero de la donante

Fuente: (Rippe, 2009)

Con el balón formado, el folley se fija para luego proceder a conectar el equipo de circuito cerrado; el medio de lavado de embriones está constituido por PBS + 1% de SFB (suero fisiológico fetal bovino) el cual se mantiene a temperatura de 37°C, previa utilización. Se utilizó 500 ml del suero para cada cuerno. Con una llave de entrada y salida del suero fisiológico fetal bovino se va suministrando dosis pequeñas de suero a cada cuerno hasta que este se llene para luego dar masajes leves por todo el cuerno cuyo objetivo es que los embrioncitos circulen y emerjan desde el sitio de localización y por gravedad descendan hasta el filtro colector, que consta de una malla de acero inoxidable con poros de 60-90 µm de diámetro lo que evita el paso del embrión y pérdida; el diámetro del embrión es de aproximadamente 150-190 µm.

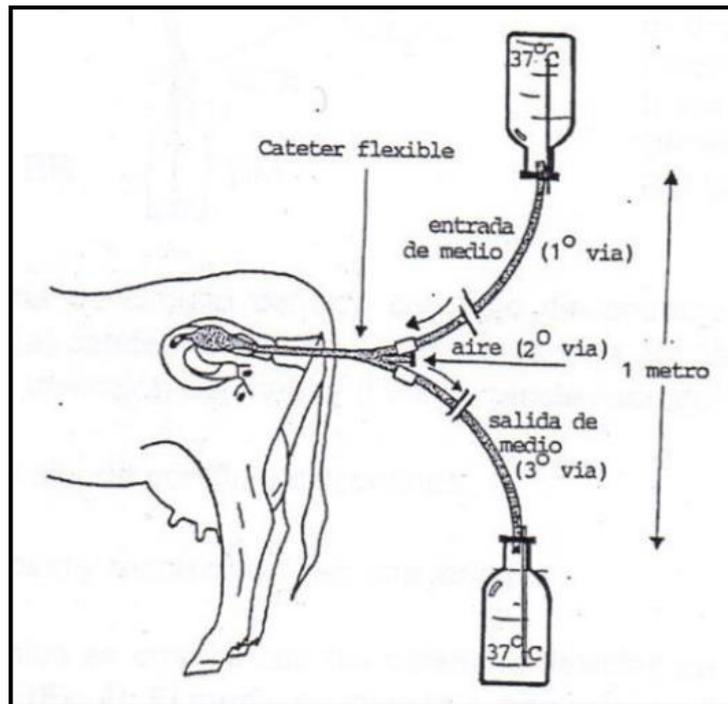


Figura 8 Esquema del circuito cerrado con flujo continuo
Fuente: (Palma, 1993)

Es de suma importancia que los filtros estén protegidos de la luz desde la colecta ya que la exposición directa puede causar lesiones a los embriones. Tras finalizar el lavado es recomendable suministrar una dosis de prostaglandina para eliminar los posibles embriones quedados en el útero.

La búsqueda de los embriones en el laboratorio se realizó en forma horizontal y vertical (ver Figura 9); los embriones encontrados se depositan en otra caja Petri de dos o cuatro posillos, que contiene medio para conservación de embriones (Holding), esta operación se repitió de 5 o 6 veces a fin de “lavar” los embriones con este medio.

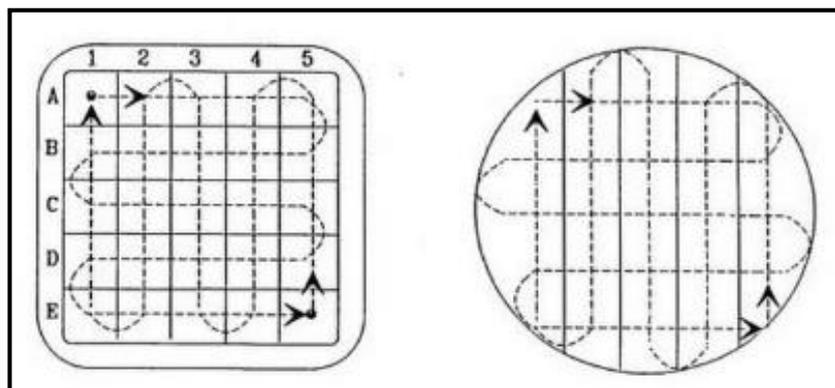


Figura 9 Procedimiento de búsqueda de embriones
Fuente: (Palma, 1993)

3.3.2.4 Evaluación de la calidad de los embriones

Para la evaluación y clasificación de la calidad de los embriones, nos basamos en la clasificación realizada por la IETS (ver Tabla 1) tomando en consideración las características que son más importantes como: tamaño, forma, apariencia, homogeneidad e intensidad de color de las células embrionarias.

Para obtener una mejor clasificación se fotografió a los embriones obtenidos de cada donadora con una cámara de 16 megapíxeles (Samsung S6 edge).

3.3.2.5 Criopreservación de los embriones

Los embriones que se criopreservan son aquellos de Grados de Calidad I y II; los embriones con grados de calidad III y IV fueron desechados, su probabilidad de vida es nula. Aquellos embriones de calidad I y II, una vez lavados en el medio holding, se transfieren al medio de criopreservación, o medio freeze llamada Etilenglicol. Posteriormente, se los envasa en pajuelas de 0,25 ml, succionando primero, una columna de medio etilenglicol, una pequeña porción de aire, luego el medio con el embrión y finalmente una porción de aire más medio, para ser sellado finalmente con mucha precaución (ver Figura 10).

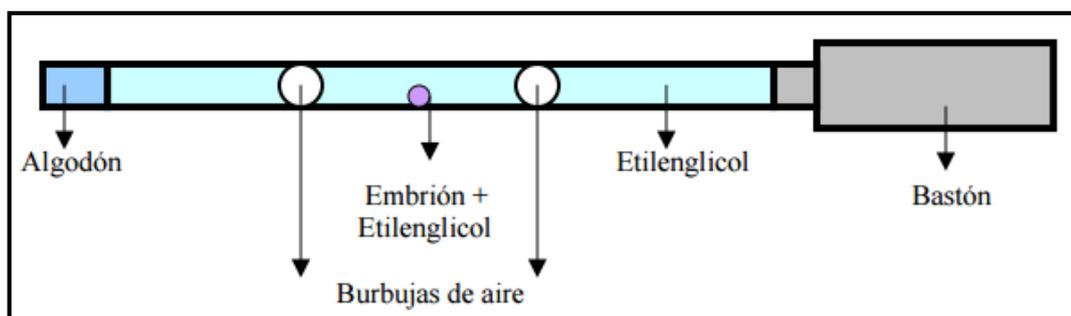


Figura 10 Esquema del llenado de la pajuela con un embrión congelado

Fuente: (Görlach, 1997)

Para la congelación de los embriones se utilizó un programa especial adaptado al congelador de embriones FREEZE CONTROL® cuyo es modelo

CL-5500 SYSMTEM (ver Figura 11), dicho programa está compuesto por tres fases:

- Fase de estabilización: Se desarrolla durante los primeros 10 minutos de iniciado el programa 4, en el cual la temperatura deberá alcanzar los $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, pasado este tiempo se detiene el programa y se realiza el "seeding" que consiste en darle un toque a la pajuelas que contiene cada embrión con una pinza o un hisopo enfriado previamente a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido.
- Fase de descenso de temperatura: Una vez realizado el seeding se continúa con el descenso de la temperatura dicho descenso debe ser controlado, hasta que no se producen más cambios de volumen, llegando a una temperatura de $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Fase de congelación: Ya alcanzada la temperatura de $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ el programa finaliza automáticamente; en ese momento las pajuelas cargadas de embriones deberán ser sumergidas directamente en nitrógeno líquido a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ posteriormente se las almacena en una canastilla rotulada de un termo banco de conservación hasta ser implantados en "receptoras".

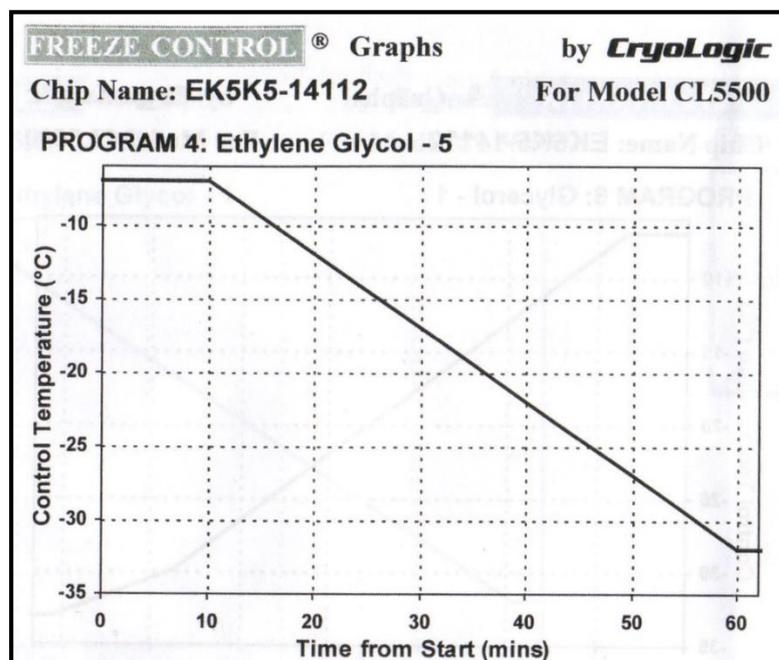


Figura 11 Curva de congelación para embriones bovinos
Fuente: (Manual Freeze Control®, s/a)

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Número de embriones colectados

Debido al número de reproductoras donantes en los resultados de los embriones obtenidos no se encontró diferencias significativas (ver Tabla 5) entre los tratamientos. Sin embargo el protocolo 1 arrojó 5,5 embriones en promedio por colecta; dicho resultado se asemeja con aquellos obtenidos por Mejía y Vazquez (2002); así como por Gordón (2016) quienes manifiestan haber alcanzado 5,6 embriones por colecta en promedio, utilizando la hormona FSH-p.

Tabla 5. Promedio \pm error estándar del N° de embriones de dos protocolos de superovulación

Tratamiento	N° de embriones	
Protocolo 1	5,50 \pm 1,88	a
Protocolo 2	2,83 \pm 1,38	a

p=0,2783

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

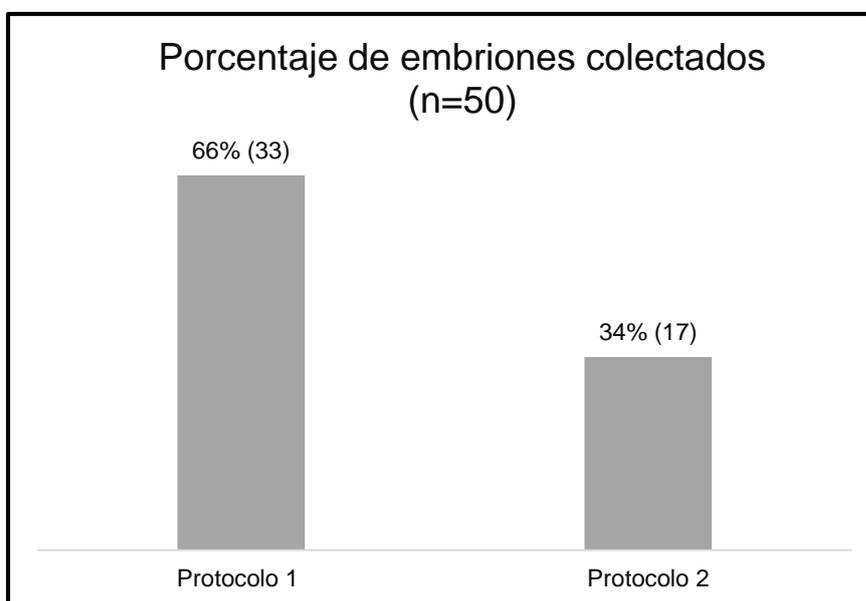
Test: Tukey

(Gordon, 2016)

En la Tabla 6, se refleja el número de embriones totales obtenidos por vaca aplicando el protocolo 1 de superovulación, en el mismo se obtuvieron 33 embriones, superando al protocolo 2 que arrojó 17 embriones (ver Figura 12). Los resultados corroboran con los datos obtenidos por Cordovez (2010) y Gordón (2016) quienes obtuvieron 34 y 50 respectivamente en su investigación, utilizando FSH-p.

Tabla 6. Número de embriones por vaca obtenidos en cada protocolo

Nº donadora	Nº de embriones		
	Protocolo 1	Protocolo 2	
94	8	8	
133	1	0	
141	6	0	
140	13	2	
178	1	1	
172	4	6	
Total (n)	33	17	=50
Total (%)	66%	34%	=100%

**Figura 12 Número total de embriones colectados en cada**

4.2 Grados de calidad y estado de desarrollo de los embriones

En los grados de calidad I, II y III, no se encontró diferencias estadísticas significativas en el número de embriones obtenidos en los tratamientos, pero sí hubo en los encontrados de grado de calidad IV (ver Tabla 7).

Tabla 7. Grados de calidad embrionaria en respuesta a dos protocolos de superovulación

Tratamiento	Grados de calidad embrionaria (n)				Total de embriones
	Excelente (I)	Bueno (II)	Regular (III)	*Malo (IV)	
Protocolo 1	11 ^a	13 ^a	3 ^a	6 ^a	33
Protocolo 2	8 ^a	7 ^a	1 ^a	1 ^b	17

*p=0,0219
Test: Tukey

Cabe recalcar que en los estadios (multiplicación celular) de los embriones colectados, tampoco se encontró diferencia significativa en los tratamientos (ver Tabla 8).

Tabla 8. Estadio embrionario en respuesta a dos protocolos de superovulación

Tratamiento	Estadio embrionario (n)							Total de embriones
	2-12 células	Mt	M	Bt	B	Be	Bp	
Protocolo 1	3 ^a	1 ^a	12 ^a	2 ^a	11 ^a	4 ^a	0	33
Protocolo 2	1 ^a	1 ^a	8 ^a	0 ^a	6 ^a	1 ^a	0	17

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)
Mt: mórula temprana
M: mórula
Bt: blastocisto temprano
B: blastocisto
Be: blastocisto expandido
Bp: blastocisto protruido
Test: Tukey

Cabe manifestar que los resultados obtenidos por Betancourth & Cáceres (2011) utilizando FSH-p son diferentes a los obtenidos en la presente investigación dado que aquellos investigadores, obtuvieron mayor porcentaje de embriones en estadio de Blastocisto (37,21%) y menor porcentaje de embriones en estadio de Mórula (4,65%), lo que no sucede en el desarrollo del presente proyecto de investigación donde se obtiene mayor porcentaje de embriones en estadio de Mórula (24%

protocolo 1 y 26% protocolo 2) y un menor porcentaje de embriones en estadio de Blastocisto (22% protocolo 1 y 12% protocolo 2)

Cabe dejar constancia que los resultados de este trabajo investigativo son similares a los de Gordón (2016), puesto que el autor compartió la presente investigación con la antes mencionada investigadora. (ver Figura 13).

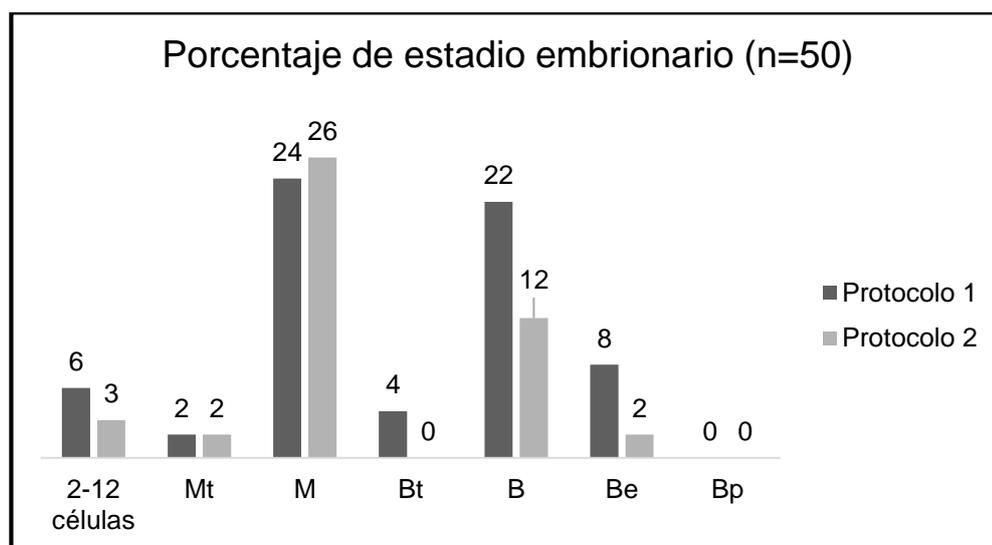


Figura 13 Estadio embrionario en respuesta a dos protocolos de superovulación

El mayor porcentaje de embriones viables, que tienen como característica los estadios de Mórula y Blastocisto se los obtuvo en el protocolo 1 con grados de calidad I y II (ver Tabla 9); de acuerdo a lo expuesto por Medina (2014) se logra mejores tasas de preñez, implantación y nacidos vivos con la transferencia de embriones en estadio de Blastocistos.

Tabla 9. Efecto del estadio y la calidad embrionaria en respuesta a dos protocolos de superovulación

Tratamiento	Estadio	Calidad embrionaria (n)	
		Excelente (I)	Bueno (II)
Protocolo 1	M	2	4
	B	6	5
Protocolo 2	M	4	3
	B	3	3

4.3 Costo de producción por vaca "donante lavada"

Para realizar el costo de este parámetro, se considera aquellos valores invertidos en: hormonas, semen bovino, relajantes musculares, anestésico, materiales (circuito cerrado, filtros, guantes), medios de lavados y capacitación.

El costo para superovular una vaca donante, en el protocolo 1 fue de \$446,87 (dólares americanos) (ver Tabla12). y, para el protocolo 2 fue \$418,37 (ver Tabla 13). por donante. La diferencia económica se refleja en el número de aplicaciones de la hormona FSH-p. Se menciona que estos valores económicos no incluyen mano de obra profesional.

Tabla 10. Costo de producción por donadora lavada

Costo de Producción total (n)	
Tratamiento	Valor(\$)
Protocolo 1	446,87
Protocolo 2	418,37

4.4 Valor por embrión viable colectado

Dentro del análisis financiero realizado por el autor, se determina que los valores por embrión viable colectado en el protocolo No.1 (24 embriones) resultaron más económicos (\$141,48 dólares americanos), mientras que aquellos obtenidos en el protocolo No. 2 se valoraron en \$185,95 dólares americanos.

Tabla 11. Costo de producción por embrión colectado en respuesta a dos protocolos de superovulación

Costo de Producción total (n)		
Tratamiento	Valor(\$)	Embriones empaquetados
Protocolo 1	141,48	24
Protocolo 2	185,95	15

Tabla 12. Costo de producción por vaca superovulada en el Protocolo 1

DETALLE	CANTIDAD Requerida	PRECIO UNIT (\$)	PRECIO TOTAL (\$)
FSH-p /20ml	14 ml	190,0	133,0
GnRH /10ml	3 ml	19,81	5,94
Progesterona /20ml	6 ml	46,5	13,95
Benzoato de Es/50ml	2 ml	28,0	1,12
CIDR® /10unid	1 unid	15,0	15,0
Progesterona /10ml	2 ml	13,0	2,60
Flunixin / 50ml	5 ml	20,0	2,0
Lidocaina /50ml	3 ml	3,60	0,21
Semen Select Sires	3 unid	45,00	135,00
Suero Fetal /500ml	500 ml	55,0	55,0
Sondas Foley 2 vías	1 unid	26,0	26,0
Mangueras Cateter	1 unid	14,0	14,0
Filtro de Embriones	1 unid	18,0	18,0
Placa Búsqueda	1 unid	1,80	1,80
Placa de dos pasillos	1 unid	2,40	2,40
Etilenglicol	4 ml	34,0	17,0
Congelación /8m	4 ml	48,0	3,84
Medio Holding /50ml	4 ml	48,0	3,84
TOTAL			446,87

Tabla 13. Costo de producción por vaca superovulada en el Protocolo 2

DETALLE	CANTIDAD Requerida	PRECIO UNIT (\$)	PRECIO TOTAL (\$)
FSH-p /20ml	11 ml	190,0	104,50
GnRH /10ml	3 ml	19,81	5,94
Progesterona /20ml	6 ml	46,5	13,95
Benzoato de Es/50ml	2 ml	28,0	1,12
CIDR® /10unid	1 unid	15,0	15,0
Progesterona /10ml	2 ml	13,0	2,60
Flunixin / 50ml	5 ml	20,0	2,0
Lidocaina /50ml	3 ml	3,60	0,21
Semen Select Sires	3 unid	45,00	135,00
Suero Fetal /500ml	500 ml	55,0	55,0
Sondas Foley 2 vías	1 unid	26,0	26,0
Mangueras Cateter	1 unid	14,0	14,0
Filtro de Embriones	1 unid	18,0	18,0
Placa Búsqueda	1 unid	1,80	1,80
Placa de dos pasillos	1 unid	2,40	2,40
Etilenglicol	4 ml	34,0	17,0
Congelación /8m	4 ml	48,0	3,84
Medio Holding /50ml	4 ml	48,0	3,84
TOTAL			418,36

CAPÍTULO V

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El protocolo que presentó mayor número de embriones colectados es el No. 1 (T1), con un total de 33 que representa el 66%, versus el protocolo 2 (T2), donde se obtuvo 17 embriones, representando el 34%.
- El protocolo 1 (T1), fue el tratamiento que presentó mayor cantidad de embriones de calidad, grado I, de denominación excelente (11 embriones). Mientras que el protocolo 2 (T2), presentó 8 embriones excelentes; esto a pesar de no existir diferencias significativas entre los tratamientos.
- Los embriones con grado de calidad II también fueron criopreservados; el protocolo 1 (T1) mostró un total de 13 embriones siendo superior al protocolo 2 (T2), que arrojó 7 embriones, pese a no haber diferencia significativa.
- El costo de superovulación por reproductora “donante” oscila entre los \$418,36 y 446,87, dependiendo del tipo de semen que se utilice y los días de tratamiento hormonal.

5.2 Recomendaciones

- Por los resultados obtenidos en la presente investigación, se recomienda la utilización del protocolo 1 (T1), manejado con precisión en la aplicación.
- Se recomienda utilizar un mayor número de vacas donantes con el objetivo de comparar con otros protocolos.
- Los bretes adecuados para la colecta de los embriones es fundamental para los profesionales de campo puesto que facilita el trabajo con mayores resultados en el número de embriones cosechados.
- Para las Instituciones que tomen decisiones de realizar tratamientos super ovulatorios con donantes de alto mérito genético, es importante la revisión anatómica del cérvix para evitarse complicaciones al momento de las inseminaciones artificiales y de los lavados uterinos para rescatar los embriones.

- Se recomienda continuar con más investigaciones aplicando nuevas hormonas super ovulatorias.

5.3 Bibliografía

- Alberio, R. (1999). *Producción in vitro de embriones bovinos*. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/05-produccion_embriiones.pdf
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., . . . Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación en bovino. *Sitio argentino de produccion animal*. Obtenido de http://produccionbovina.com/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf
- Betancourth, J. F., & Cáceres, G. (2011). *Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales*. Tesis de ingeniería, Zamorano, Honduras. Obtenido de <http://docplayer.es/15662323-Superovulacion-y-transferencia-de-embriiones-en-vacas-lecheras-utilizando-dos-protocolos-hormonales.html>
- Brackett, B., Seidel, G., & Seidel, S. (1981). *New technologies in animal breeding* (Vol. 7). New York: Academic press.
- Cabodevilla, J., & Torquatri, S. (2001). Superovulação de Fêmeas bovinas. *Biotecnología de la reproducción*, 1, 79-108.
- Callensen, H., Greve, T., & Hyttel, P. (1986). Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 25, 71-76.
- Calva, B., Cortés, R., Aja, S., Ortiz, F., & Cevenini, G. (2001). La Transferencia de embriones. Una técnica de mejoramiento animal en ganado de lidia. *Cirujia y Cirujanos*, 129-134.
- Córdova, A., Guerra, J., Mancera, A., Olivares, J., Arroyo, G., Juárez, M., & Pérez, J. (2015). Embruo freezing cattle. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9(2), 22-40. Obtenido de <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/51041/47391>

- Cordovez, Z. (2010). *Evaluación de los parámetros productivos y reproductivos en la transferencia de embriones en vacas de la Hacienda Miraflores Bajo N°2*. Tesis ingeniería , Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Riobamba. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1032/1/17T01031.pdf>
- Cutini, A., Turuel, M., & Cabodevilla, J. (2000). Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Taurus*, 7, 28-39. Obtenido de <http://vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Obstetricia%20e%20inseminacion%20artificial/Documentos/Embrionaria.pdf>
- Dietl, J. (1986). *Struktur and funktion der zona pellucida*. Stuttgart: Ferdinans enke verlag.
- Dobrinsky, J. (1996). Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45(1), 17-26.
- Dobrinsky, J. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57, 285-602.
- FEDEGAN. (2015). *Fedegan Ecuador*.
- Garzón, N., Urrego, R., & Giraldo, C. (2007). Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2), 68-77. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428098008>
- Garzón, N., Urrego, R., & Giraldo, C. (2007). Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *CS Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2), 68-77.
- Gordon, V. (2016). *Evaluación de la Calidad Embrionaria en Respuesta a dos Protocolos de Superovulación en Ganado Bovino*. Quito.
- Görlach, A. (1997). *Transferencia de embriones en ganado vacuno*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Guido, M. C. (18 de mayo de 2005). *Transferência de embriões*. Obtenido de http://www.mcguido.com.br/transf__embriao.htm

- Jiménez, C. (2009). Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Revista de medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56, 195-214.
- Lamb, G., Smith, M., Perry, G., Atkins, J., Risley, M., Busch, D., & D, P. (2009). Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle. *North Florida Research and Education Center*.
- Leibo, S. (1985). The embryology of embryo transfer. En S. Leibo, *Embryo transfer in cattle* (págs. 32-53). Lloyd Donaldson.
- Linder, G., & Wright, R. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), 407-416.
- Lucy, M. (2006). Estrus: Basic Biology and Improving Estrous Detection. *Dairy Cattle Reproductive Conference*, 29-37.
- Mazur, A. (1966). *Cryobiology* (Primera ed.). New York: Academic Press.
- Medina, R. (2014). Transferencia de blastocistos es realmente lo ideal? - AVEMERE. *Reproductive BioMedicine*(28), 485-491. Obtenido de http://www.avemere.org.ve/pres/Transferir_embriones.pdf
- Mejía, R., & Vazquez, C. (2002). *Evaluación en la técnica de transferencia de embriones bajo las condiciones de Zamorano*. Tesis ingeniería, Escuela Agrícola Panamericana.
- Mogollón, É., & Burla, A. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus*, 9.
- Noden, D., & Lahunta, A. (1985). Early stages of development in bird and mammals. En Williams, & Wilkins, *The embryology of domestic animals* (págs. 23-46). Stamathis.
- OÑATE, R. H. (2003). I INFORME SOBRE RECURSOS ZOOGENETICOS ECUADOR. *MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA*, 7-8.
- Palma, G. (1993). Recolección de los embriones. En G. Palma, & G. Brem, *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina* (Primera ed., págs. 105-126). Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur S.A.
- Papadopoulos, S., Rizos, D., Duffy, P., Wade, P., Quinn, K., Boland, M., & Lonergan, P. (2002). Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Anim Repro Sci*, 74, 35-44.

- Pedersen, R. (1988). Early mammalian embryogenesis. En E. Knobil, & Neil, *The physiology of reproduction* (págs. 187-230). New York: Raven Press. Ltd.
- Pérez, J. C. (8 de Abril de 2015). *Líderes*. Obtenido de <http://www.revistalideres.ec/lideres/ecuador-importacion-ganado.html>
- Portal veterinario Albéitar. (17 de Octubre de 2003). *Congelación de embriones bovinos producidos in vitro*. Obtenido de <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3387/articulos-rumiantes-archivo/congelación-de-embriones-bovinos-producidos-in-vitro.html>
- Rasbech, N. (1976). *Nicht-chirurgische Gewinnung und Übertragung von Rinderembryonen unter Praxis Verhältnissen Dtsch Tierärztl Wschr* 83.
- Rippe, C. (2009). El ciclo estral. *Dairy Cattle Reproduction Conference*, 111. Obtenido de <http://www.dcrcouncil.org/media/Public/Rippe%20DCRCH%202009.pdf>
- Roa, N., Linares, T., & Tamasaukas, R. (1998). Methods and applications of bovine and other mammals oocytes and embryos cryopreservation. *Revista científica FCV-Luz*, VIII(1), 40-52. Obtenido de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27058/2/articulo6.pdf>
- RUBEN, O. H. (2003). I INFORME SOBRE RECURSOS ZOOGENICOS ECUADOR. 7-8.
- Senger, P. (2003). *Pathways to pregnancy and parturition* (Segunda ed.). Pullman, Washington, USA: Cadmus Professional Communications.
- Shea, B., Hines, D., Lightfoot, D., Ollis, G., & Olson, S. (1976). *The transfer of bovine embryos*. Luxemburg: Rowson, L.E.A.
- Shearer, J. (2003). Reproductive Anatomy and Physiology of Dairy Cattle. *Animal Science Department, Florida Cooperative*.
- Stingfellow, D., & Siedel, S. (2000). *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS)*. Illinois, USA. Obtenido de <http://www.iets.org>
- Valeria, G. C. (2016). Quito.
- Vásquez, M., Cueva, S., Cordero, A., Gonzales, M., & Huanca, W. (2011). Evaluation of two embryo cryopreservation methods in llama on the in vivo e in vitro embryonic survival rates. *Inv Vet*, 22(3), 190-198. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v22n3/a03v22n3.pdf>

