

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



**“VITRIFICACIÓN EN DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE
EMBRIONES IN VITRO EN VACAS BROWN SWISS EN EL ESTABLO
SANTIAGO - PUNO”**

TESIS

**PRESENTADA POR:
FREDY QUISPE QUISPE**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

**MENCIÓN:
ZOOTECNIA**

PROMOCIÓN: 2012 - I

PUNO – PERÚ

2018

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

**“VITRIFICACIÓN EN DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE
EMBRIONES IN VITRO EN VACAS BROWN SWISS EN EL ESTABLO SANTIAGO -
PUNO”**

TESIS

PRESENTADA POR:

FREDY QUISPE QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

MENCIÓN: ZOOTECNIA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 22 DE AGOSTO DEL 2018



APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE

:

Ing. M. Sc. Julio Macario CHOQUE LAZARO

PRIMER MIEMBRO

:

D. Sc. Ali William CANAZA CAYO

SEGUNDO MIEMBRO

:

Ing. M. Sc. Jesús SANCHEZ MENDOZA

DIRECTOR / ASESOR

:

Ing. M. Sc. Luis Amador BUENO MACEDO

PUNO – PERÚ

2018

Área : Ciencias agrícolas

Tema : Producción animal

DEDICATORIA

A Dios por protegerme y darme un día más de vida cada día, darme entendimiento y conocimiento cada día; de regalarme una maravillosa familia.

Con profundo cariño y mucho amor a mis queridos padres por brindarme todo su apoyo y comprensión: Julián Quispe Ticona y Mauricia Quispe Flores quienes supieron proyectarme por el camino del saber e hicieron posible la culminación de mi formación profesional.

A mis hermanos Hernán, Jhon Elvert, Angel Julián y Sandra Fiorela por el apoyo incondicional y constante, de los cuales aprendí a nunca dejar de esforzarme y perseguir mis objetivos.

A una persona muy especial en mi vida Jessica Milagros por su apoyo incondicional su comprensión, cariño y amor con quien comparto un sentimiento sincero.

Fredy Quispe Q.

AGRADECIMIENTOS

Infinitamente a Dios protegiéndome cada paso en el sendero de mi vida, guiándome por el camino del bien y fortaleciendo mi ser, el deseo de vivir para servir con humildad y entusiasmo.

A la Universidad Nacional del Altiplano y en especial a la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica.

A la plana docente de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica, por brindarnos los conocimientos y motivarnos frente a los nuevos retos, de igual forma al personal administrativo de la EPIA por el apoyo a la labor académica.

Mi reconocimiento y agradecimiento a los miembros del jurado: Ing. M. Sc. Julio Macario Choque Lázaro, D. Sc. Ali William Canaza Cayo e Ing. M. Sc. Jesús Sánchez Mendoza, en gratitud a sus conocimientos y enseñanzas durante mi formación profesional, y como también por el apoyo constante en la culminación del presente trabajo de investigación.

Con mucho agradecimiento al director de tesis Ing. M. Sc. Luis Amílcar Bueno Macedo, por su guía y apoyo incondicional brindado durante la elaboración y culminación del presente trabajo de investigación.

A todas aquellas personas y amigos que me han apoyado directa e indirectamente para la culminación de mi trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 10 |
| ABSTRACT..... | 11 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 14 |
| 2.1.- Anatomía del tracto genital de la vaca | 14 |
| 2.1.1.- Anatomía..... | 14 |
| 2.1.2.- Sistema endocrino..... | 16 |
| 2.2.- Fisiología reproductiva de la vaca | 18 |
| 2.2.1.- Ovulación..... | 18 |
| 2.2.1.1.- Fisiología de la ovulación | 18 |
| 2.2.2.- Cuerpo lúteo..... | 19 |
| 2.2.2.1.- Fisiología del cuerpo lúteo..... | 19 |
| 2.3.- Donantes de embriones..... | 20 |
| 2.3.1.- Criterios genéticos de selección..... | 20 |
| 2.3.2.- Criterios no genéticos de selección..... | 21 |
| 2.3.2.1.- Factores ligados a la vaca | 22 |
| 2.4.- Superovulación de donantes | 24 |
| 2.5.- Manipulación de embriones..... | 27 |
| 2.5.1.- Obtención de embriones | 27 |
| 2.5.2.- Evaluación de embriones | 27 |
| 2.6.- Selección de receptoras..... | 31 |
| 2.6.1.- Características de las receptoras | 31 |
| 2.6.2.- Sincronización de receptoras | 32 |
| 2.6.3.- Transferencia | 33 |
| 2.6.4.- Transmisión de enfermedades | 33 |
| 2.7.- Criopreservación de embriones | 34 |
| 2.7.1.- Principios básicos de la criopreservación | 35 |
| 2.7.2.- Influencia de la velocidad de congelación..... | 36 |
| 2.7.3.- Crioprotectores de los embriones | 37 |
| 2.7.3.1.- Crioprotectores permeables | 37 |
| 2.7.3.2.- Crioprotectores no permeables | 38 |
| 2.8.- Vitricación..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 2.9.- Descongelación de los embriones | 39 |
| 2.10.- Diagnóstico de preñez..... | 40 |
| 2.10.1.- Diagnóstico de preñez mediante palpación transrectal..... | 40 |
| 2.11.- Suplementación en su alimentación a vacas donantes y receptoras | 41 |
| 2.11.1.- Maralfalfa | 41 |
| 2.11.2.- Pasto maralfalfa en el Perú | 42 |
| 2.11.3.- Características generales de la maralfalfa..... | 42 |
| 2.11.4.- Usos de la maralfalfa | 43 |
| 2.11.5.- Análisis de contenido nutricional | 43 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 44 |
| 3.1.- Lugar de ejecución..... | 44 |
| 3.2.- Material experimental | 44 |
| 3.2.1.- Duración del periodo experimental | 44 |
| 3.2.2.- Vacas donadoras de embriones..... | 44 |
| 3.2.3.- Vacas receptoras de embriones..... | 45 |
| 3.2.4.- Pajillas de semen..... | 45 |
| 3.2.5.- Sistema de crianza y alimentación de las vacas donadoras | 46 |
| 3.3.- Método de producción de los embriones y sincronización de receptoras..... | 47 |
| 3.3.1.- Superovulación e inseminación de las donantes de embriones | 47 |
| 3.3.2.- Sincronización de receptoras | 48 |
| 3.4.- Preparación de los materiales y medios | 49 |
| 3.4.1.- Materiales y medio de colección y mantenimiento de los embriones | 49 |
| 3.4.1.1.- Preparación de los materiales y medio de colección | 49 |
| 3.4.1.2.- Medio de mantenimiento de los embriones | 49 |
| 3.4.2.- Medios de vitrificación de los embriones | 50 |
| 3.4.2.1.- Vitrificación con propilenglicol + glicerol (Pg+Gli) | 50 |
| 3.4.2.2.- Vitrificación con etilenglicol + glicerol (Eg+Gli) | 50 |
| 3.5.- Recolección de los embriones..... | 51 |
| 3.6.- Búsqueda de embriones | 52 |
| 3.6.- Evaluación de los embriones | 53 |
| 3.7.- Procedimiento de crio preservación..... | 55 |
| 3.7.1.- Vitrificación con propilenglicol + glicerol (protocolo 1) | 55 |
| 3.7.2.- Vitrificación con etilenglicol + glicerol (protocolo 2)..... | 56 |
| 3.8.- Descongelación de embriones | 57 |

| | |
|--|-----------|
| 3.9.- Evaluación de los embriones post descongelación | 57 |
| 3.10.- Transferencia de embriones | 58 |
| 3.11.- Diagnóstico de preñez..... | 60 |
| 3.11.1.- Mediante la palpación rectal | 60 |
| 3.10.- Análisis estadístico | 61 |
| 3.10.1.- Diseño estadístico para determinar la calidad del embrión | 61 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 63 |
| 4.1. Embriones y óvulos obtenidos de vacas Brown Swiss | 63 |
| 4.2. Calidad de los embriones por vaca donadora..... | 63 |
| 4.3. Embriones post vitrificados con el protocolo 1 y protocolo 2 | 64 |
| 4.3.1.- Calidad 1 (excelentes)..... | 64 |
| 4.3.2.- Calidad 2 (buenos)..... | 67 |
| 4.3.3.- Calidad 3 (regulares)..... | 69 |
| 4.3.4.- Calidad 4 (malos)..... | 71 |
| 4.4.- Porcentaje de preñez en vacas receptoras de embriones vitrificados con Protocolo 1 y Protocolo 2..... | 73 |
| 4.5.- Costo de la vitrificación de embriones..... | 74 |
| CONCLUSIONES | 76 |
| RECOMENDACIONES | 77 |
| REFERENCIAS..... | 78 |
| ANEXOS..... | 84 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Clasificación de los embriones (De la Fuente J, 1989) | 28 |
| Figura 2: Ubicación geográfica del establo Santiago | 44 |
| Figura 3: Donadoras de embriones | 45 |
| Figura 4: Catalogo del toro solitario | 46 |
| Figura 5: Protocolo de superovulacion de vacas donadoras | 47 |
| Figura 6: Protocolo de sincronizacion de vacas receptoras | 49 |
| Figura 7: Medio de lavado uterino, estilete, dilatador, sonda Foley y pinzas (a), sonda Foley con estilete (b), sonda Foley con camisa sanitaria (c) y preparación del filtro y mangueras (d). | 49 |
| Figura 8: Lavado del cuerpo uterino para la recolección de embriones | 52 |
| Figura 9: Filtro protegido de la luz solar en el lavado uterino (a), filtro con los embriones en el laboratorio (b). | 52 |
| Figura 10: Vaciado y enjuague del filtro a la placa Petri cuadrículada (a), búsqueda de los embriones en la placa Petri cuadrículada (b). | 53 |
| Figura 11: Clasificación de los embriones según su estado de desarrollo | 54 |
| Figura 12: Clasificación de los embriones según su estado de desarrollo y calidad. | 58 |
| Figura 13: Embriones a transferir (a), embrión cargado a la pajuela (b), embrión cargado a la pistola de transferencia (c) y transferencia a la vaca receptora (d). | 60 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Análisis nutricional de la maralfalfa | 43 |
| Cuadro 2. Embriones vitrificados con Protocolo 1 (propilenglicol + glicerol) | 55 |
| Cuadro 3. Embriones vitrificados con Protocolo 2 (etilenglicol + glicerol)..... | 56 |
| Cuadro 4. Embriones transferidos según su estado de desarrollo y calidad con cada protocolo..... | 59 |
| Cuadro 5. Vacas receptoras preñadas y no preñadas con el propilenglicol + glicerol y etilenglicol + glicerol..... | 61 |
| Cuadro 6. Número de embriones y óvulos obtenidos de las tres donadoras | 63 |
| Cuadro 7. Embriones clasificados según su calidad. | 63 |
| Cuadro 8. Clasificación de los embriones post vitrificación con el protocolo 1 y protocolo 2 según su calidad..... | 64 |
| Cuadro 9. Embriones de calidad 1 con datos transformados a $\sqrt{(x+0.5)}$ | 64 |
| Cuadro 10. Análisis de varianza para embriones excelentes (calidad 1). | 65 |
| Cuadro 11. Prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) para embriones calidad 1 (excelentes)..... | 65 |
| Cuadro 12. Embriones de calidad 2 con datos transformados a $\sqrt{(x+0.5)}$ | 67 |
| Cuadro 13. Análisis de varianza para embriones buenos (calidad 2). | 67 |
| Cuadro 14. Prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) para embriones calidad 2 (buenos) | 68 |
| Cuadro 15. Embriones de calidad 3 con datos transformados a $\sqrt{(x+0.5)}$ | 69 |
| Cuadro 16. Análisis de varianza para embriones regulares (calidad 3). | 70 |
| Cuadro 17. Embriones de calidad 4 con datos transformados a $\sqrt{(x+0.5)}$ | 71 |
| Cuadro 18. Análisis de varianza para embriones malos (calidad 4). | 71 |
| Cuadro 19. Prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) para embriones calidad 4 (malos) | 71 |
| Cuadro 20. Resultados obtenidos de vacas criollas preñadas y no preñadas..... | 73 |
| Cuadro 21. Costo de la vitrificación de los embriones por protocolo | 74 |

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el establo Santiago, que está ubicado a 2 km. al oeste de la ciudad de Puno, entre latitudes de E 390251.01, S 8244983.5 y a una altitud de 4108 m.s.n.m., departamento, provincia y distrito de Puno, en el sector Carmen de Cancharani; la investigación con los objetivos de determinar la calidad de embriones vitrificados con dos protocolos propilenglicol + glicerol (protocolo 1) y etilenglicol + glicerol (protocolo 2), determinar el porcentaje de preñez en vacas receptoras de embriones vitrificados con propilenglicol + glicerol (protocolo 1) y etilenglicol + glicerol (protocolo 2) y determinar el costo de vitrificación con propilenglicol + glicerol (protocolo 1) y etilenglicol + glicerol (protocolo 2), para lo cual se utilizaron tres vacas donadoras de los embriones de la raza Brown Swiss, y se obtuvo un total de 33 embriones de los que se seleccionaron según su calidad y estado de desarrollo 26 embriones que fueron vitrificados, agrupándolos en dos grupos de trece embriones para cada protocolo. Estos embriones fueron sometidos a un proceso de vitrificación, luego desvitrificados y se clasificaron nuevamente según su calidad y estado de desarrollo, obteniendo como resultado que con el propilenglicol + glicerol se obtuvo 7 embriones y con el etilenglicol + glicerol se obtuvo 10 embriones considerados como embriones viables de calidad 1 y 2 según su clasificación morfológica; posteriormente se obtuvo 6 embriones con el propilenglicol + glicerol y 3 embriones con el etilenglicol + glicerol, considerados como embriones no viables de calidad 3 y 4. Los embriones clasificados según su calidad 1 y 2, fueron transferidos a las vacas receptoras en dos grupos de 6 vacas para cada protocolo. El porcentaje de preñez obtenido fue de 33.33% con el propilenglicol + glicerol y 66.67% de preñez con el etilenglicol + glicerol, se concluye que con el uso del protocolo 2 se obtiene mayor porcentaje de embriones de buena calidad y también mayor porcentaje de preñez. El costo de la vitrificación por cada embrión con el propilenglicol + glicerol que es de s/ 32.88, y con el etilenglicol + glicerol es de s/ 33.64.

Palabras Clave: Embriones, vitrificación, donadoras, protocolo y preñez en vacas.

ABSTRACT

This research work was carried out at the Santiago stable, Which is located 2 km west of the city of Puno, Between latitudes of E 390251.01, S 8244983.5 and at an altitude of 4108 m.s.n.m., Puno department, Province and district, In the sector Carmen de Cancharani; Research with the objectives of To determine the quality of vitrified embryos with two protocols Propylene glycol glycerol (protocol 1) and ethylene glycol glycerol (protocol 2), To determine the percentage of pregnancy in recipient cows of vitrified embryos With propylene glycol glycerol (protocol 1) and ethylene glycol glycerol (protocol 2) and determine the cost of vitrification with propylene glycol glycerol (protocol 1) and ethylene glycol glycerol (protocol 2), For which three cows donated from the embryos of the Brown Swiss breed were used, and obtained a total of 33 embryos of which were selected according to their quality and developmental status 26 embryos that were vitrified, Grouped in two groups of thirteen embryos for each protocol. These embryos were subjected to a process of vitrification, Then devitrified and re-classified according to their quality and state of development, Getting as a result That with propylene glycol glycerol was obtained 7 embryos and with ethylene glycol glycerol obtained 10 embryos considered as viable embryos of quality 1 and 2 according to their morphological classification; subsequently, 6 embryos were obtained with propylene glycol glycerol and 3 embryos with ethylene glycol glycerol, Considered as non-viable embryos of quality 3 and 4. The embryos classified according to their quality 1 and 2, were transferred to the receiving cows in two groups of six cows for each protocol. The percentage of pregnancy obtained was 33.33% with propylene glycol glycerol and 66.67% of pregnancy with ethylene glycol glicerol, It is concluded that with the use of protocol 2 is obtained higher percentage of embryos of good quality and also higher percentage of pregnancy. The cost of vitrification for each embryo with propylene glycol glycerol which is s/32.88, And with ethylene glycol glycerol is s/33.64.

Key words: Embryos, vitrification, donors, protocol and pregnancy in cows

I. INTRODUCCIÓN

Desde que en 1973 fue reportado el nacimiento del primer ternero a partir de un embrión congelado, se han realizado progresos considerables que han conducido a mejorar los métodos de vitrificación para embriones (Wilmot y Rowson, 1973).

En años recientes los mayores esfuerzos han sido dirigidos a mejorar la tasa de sobrevivencia de los embriones obtenidos *in vitro* luego de la vitrificación (Fahning y García, 1992).

En 1985, Rall y Fahy, introdujeron la vitrificación como método de criopreservar embriones de mamíferos en ausencia de hielo. Después de esta primera aplicación exitosa se supuso una rápida aplicación de este método en la embriología de animales domésticos; sin embargo, a pesar de las ventajas de la vitrificación (simplicidad, eficiente en costos, velocidad del procedimiento) ampliamente conocidas, sólo se ha restringido principalmente a estudios experimentales (Vajta, 2000).

La definición física de vitrificación es la solidificación de una solución (formación de vidrio) a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo. El fenómeno puede ser observado como un incremento en la viscosidad y requiere de rápidas tasas de congelamiento o el uso de soluciones crioprotectoras, que deprimen la formación de cristales de hielo e incrementan la viscosidad a bajas temperaturas (Vajta, 2000).

La estrategia de la vitrificación es básicamente diferente a los métodos de congelación lentos. Una tasa lenta de enfriamiento intenta mantener el delicado balance entre varios factores, los cuales pueden resultar en daño, como formación de cristales de hielo, injuria osmótica, efectos tóxicos de crioprotectores, concentración de electrolitos intracelulares, daño por enfriamiento, fractura de zona pelúcida y embrión, y alteraciones de organelas intracelulares, citoesqueleto y contacto entre células (Dobrinsky, 1996).

Por otro lado, la estrategia radical de la vitrificación ha resultado en una consecuencia positiva aparte de la total eliminación en la formación de hielo. El incremento en las tasas de enfriamiento disminuye el daño por enfriamiento, por ejemplo, daño por gotas lipídicas intracelulares, citoesqueleto y membranas de fosfolípido, pasando rápidamente a través de la zona peligrosa entre +15 ° a -5 °C (Dobrinsky, 1996).

Además, la vitrificación no requiere de equipamientos costosos o técnicas especiales y puede ser ejecutada muy rápidamente (Vajta, 2000).

Por otro lado, los métodos de vitrificación de embriones que emplean pajuelas de inseminación (0.25 ml) selladas e introducidas directamente al nitrógeno líquido, presentan una tasa de congelación aproximada de 2.500 °C/min. (Palasz y Mapleoft, 1996).

Por otra parte, muchos métodos de vitrificación utilizan pajuelas francesas estándar (french mini straw) para mantener al embrión durante la congelación, almacenamiento y descongelación, donde experimentan una tasa de congelación y descongelación menor a los 2.000 °C/min. (Vajta y Col, 1997).

En la actualidad en el Perú se han realizado pocos trabajos en la transferencia de embriones, principalmente con el uso de embriones vitrificados y menos a una altitud que superen los 4108 msnm., es por ello que también la producción y transferencia de embriones congelados mediante la vitrificación es poco comercial, con este trabajo de investigación se pretende elevar los niveles de calidad de los embriones con protocolos de vitrificación (congelación rápida), con ello también ayudara al desarrollo de los programas de producción y transferencia de embriones de vacunos en Puno ya que hoy en día tenemos muy pocos resultados.

Tomando en cuenta los protocolos de vitrificación en el presente trabajo, se propuso criopreservar embriones de vacas, con la finalidad de conocer si estos protocolos pueden ser aplicados o no a una altitud de (4108 m.s.n.m.) siendo los objetivos los siguientes:

- Determinar la calidad de embriones vitrificados con dos protocolos propilenglicol + glicerol (protocolo 1) y etilenglicol + glicerol (protocolo 2).
- Determinar el porcentaje de preñez en vacas receptoras de embriones vitrificados con propilenglicol + glicerol (protocolo 1) y etilenglicol + glicerol (protocolo 2).
- Determinar el costo de vitrificación con propilenglicol + glicerol (protocolo 1) y etilenglicol + glicerol (protocolo 2).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- Anatomía del tracto genital de la vaca

2.1.1.- Anatomía

Antes de hablar a profundidad sobre la transferencia de embriones se debe conocer todo el sistema reproductor de la vaca para identificar los puntos donde se estará trabajando al momento de inseminar, tiempo colectar y transferir los embriones.

Se debe conocer todas las partes del tracto reproductor para identificar las situaciones que presenta la hembra desde que está en celo hasta cuando pueda presentar un problema dentro del tracto reproductivo. Conocer y estudiar el tracto reproductor de la hembra es el primer paso para inseminar, colectar y transferir embriones (ABS, 2006).

A continuación, se presenta una descripción breve de las partes del tracto reproductivo:

- Ovarios: Según Hincapié (2004), en el bovino son de forma ovalada y miden 3.5 a 4 cm de longitud, 2.5 cm de ancho y 1.5 cm de espesor y su peso varía entre los 15-20 gramos. El tamaño está influenciado por el cuerpo lúteo.

En los ovarios se encuentran los folículos inmaduros, en crecimiento y maduros; dentro de los folículos se encuentran el huevo u oocito que es expulsado al momento de la ovulación. Durante un ciclo normal de la vaca solo un folículo llega a madurar y ovular, raras veces dos (ABS, 2006).

- Oviductos o Trompas de Falopio: El oviducto sostiene el ovario por medio de las fimbrias, quienes se encargan de capturar el oocito al momento de la ovulación; el oocito avanza sobre el oviducto para encontrarse con los espermatozoides y poder ser fecundado o fertilizado. El oviducto está dividido en istmo y ampulla, el punto donde se lleva a cabo la fecundación o fertilización del huevo se llama unión istmo-ampular (ABS, 2006).

- Cuernos del útero: El oviducto termina donde inicia el cuerno uterino, 9 días después, el huevo fecundado ya es un embrión maduro y ha atravesado todo el oviducto y puede estar localizado en el cuerno derecho o en el izquierdo dependiendo en donde se produjo la ovulación. En el cuerno del útero se hace el reconocimiento del embrión, las paredes del cuerno reconocen el embrión y éste es adherido a ella para dar origen al nuevo feto (ABS, 2006).

- Cuerpo del útero: éste es el lugar donde el feto va a crecer y a desarrollarse. El útero durante el celo está turgente y lleno de líquido uterino, el cual es el medio donde los espermatozoides pueden desplazarse hacia los cuernos y luego hacia el oviducto. Además, el útero está haciendo contracciones para evacuar espermatozoides muertos o cualquier patógeno que haya atravesado el cérvix, ya que al momento del celo éste se abre para permitir la entrada del esperma (ABS, 2006).

El cuerpo del útero está situado entre la cavidad abdominal y pelviana. Su longitud varía entre 3-4 cm, éste es fijado por el ligamento ancho del útero (Hincapié, 2004).

- Cérvix: También conocido como cuello del útero. Éste varía en grosor y longitud según la edad y raza de la vaca. Normalmente al palpar por vía transrectal se siente como un cuello de pollo. Al momento de la inseminación es la parte más importante del tracto, se requiere de mucha práctica y bastante experiencia para atravesar el cérvix con la pistola de inseminación y tener éxito en la I.A. o en la T.E. no quirúrgica (ABS, 2006).

-Vagina: Es un tubo de paredes mucosas que al momento del celo se encuentra lubricado por moco cervical. Cuando la vaca es preñada a través del sistema de monta natural el toro eyacula y deposita grandes cantidades de espermatozoides en la vagina.

La vagina está conectada a la vejiga urinaria, por lo tanto, también interviene en la función de evacuar la orina. Está comprendida entre el cuello del útero y la vulva (ABS, 2006).

- Vulva: Es la parte más externa del tracto, se puede apreciar a simple vista. Está formada por dos labios vulvares que forman la comisura dorsal y ventral, estos toman una coloración roja (hiperemia) y aumentan de tamaño (edema) cuando la vaca está en celo por la acción de los estrógenos (Hincapié, 2004).

2.1.2.- Sistema endocrino

Las hormonas involucradas en el sistema endocrino son las siguientes:

- Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH): Es un neurotransmisor, cuando el hipotálamo libera GnRH, ésta es receptada por la hipófisis o pituitaria anterior para que produzca la liberación de FSH y LH al torrente sanguíneo. La GnRH tiene un efecto directo sobre la oleada preovulatoria que se inicia por los altos niveles de estrógenos procedentes del folículo que se está madurando (Illera, 1994).

- Hormona Folículo Estimulante (FSH): Ésta es secretada por la hipófisis anterior. Viaja a través del torrente sanguíneo hasta llegar a los ovarios, donde desempeña su función estimulando el crecimiento y maduración de los folículos. “La FSH se utiliza principalmente en el desarrollo folicular para inducir ovulaciones múltiples con fines de T.E.” (Hafez, 1996).

- Hormona Luteinizante (LH): También producida por la hipófisis anterior, desempeña su función en el ovario ayudando en las últimas etapas de maduración y luteinización del folículo. Las altas concentraciones de estrógenos en el torrente sanguíneo tienen un efecto positivo sobre el hipotálamo, lo cual induce la oleada preovulatoria de la LH que causa la rotura de la pared folicular y la ovulación. Este es el único momento que se encuentra en altas concentraciones (Hafez, 1996).

- Estrógenos (E2): Éstos son producidos por los folículos presentes en los ovarios. Los estrógenos se encargan de preparar todo el tracto reproductivo de la vaca (ABS, 2006).

Las altas concentraciones de E2 inducen que:

- El cuerpo del útero esté turgente y produzca líquido uterino.
- El cérvix produzca moco y se abra para permitir la entrada del semen.
- La vagina se prepare para recibir el semen y esté bien lubricada.
- La vulva presente edema e hiperemia.
- La vaca muestre comportamiento homosexual.
- La vaca esté receptiva a la monta.

- Progesterona (P4): Esta hormona es producida en el ovario por el cuerpo lúteo, también por la placenta y por La glándula suprarrenal. Después que ocurre la ovulación del folículo dominante o llamado también folículo de De Graaf, lo que se forma es un cuerpo lúteo. Si el huevo liberado fue fecundado, la progesterona prepara el endometrio para la implantación del embrión, esta produce un efecto al incrementar el número de glándulas secretorias endometriales, lo cual inhiben la motilidad del miometrio para que el embrión sea reconocido, este proceso se le conoce como reconocimiento de preñez. El cuerpo lúteo se mantiene produciendo progesterona. Por eso se dice que es la hormona encargada de mantener la preñez (Gordon, 1996).

- Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}): Está encargada de romper el cuerpo lúteo, una vez que el huevo no se fertilizó o ha llegado el momento del parto. Es considerada una parahormona porque actúa localmente en el lugar donde se produce, no se encuentra en ningún tejido específico y son degradadas con rapidez en la sangre, debido a esto no se apegan a la definición clásica de hormona. Esta parahormona lisa el cuerpo lúteo, caen los niveles altos de progesterona y así los folículos comienzan nuevamente a crecer y desarrollarse (ondas foliculares) por el efecto de la FSH. Es decir, la vaca comienza un nuevo ciclo estral (Hafez, 1996).

Cerebro: La parte del cerebro involucrada es el hipotálamo, el cual produce GnRH.

Hipófisis o pituitaria anterior: Acepta el estímulo de GnRH para producir FSH y LH. Tejido sanguíneo: Se encarga en llevar el FSH y LH a los ovarios y además, los E2 y P4.

Ovario: Lugar de acción del FSH y LH.

2.2.- Fisiología reproductiva de la vaca

2.2.1.- Ovulación

La maduración de un folículo dominante en la superficie del ovario, la liberación de cantidades necesarias de estradiol y la subsiguiente liberación del ovulo a través de una estrecha herida se conoce como ovulación, la cual depende de la interacción de sustancias como las gonadotrofinas, hormonas esteroides, factores de crecimiento, entre otras. Para que se produzca este fenómeno es necesario que se rompan todas las capas celulares que separan al ovocito del exterior del folículo, tales como: el epitelio superficial del ovario, túnica albugínea, la membrana basal y el estrato granuloso (Hincapie, 2005; Duica, 2010).

2.2.1.1.- Fisiología de la ovulación

Fisiológicamente, la ovulación es el resultado de la breve liberación preovulatoria de LH, la cual se produce tras un espacio de tiempo característico de cada especie que discurre entre la máxima liberación de LH y la ovulación, proceso que en la vaca tiene una duración promedio de 30 horas de haberse iniciado el estro. La producción de estrógenos por el folículo terminal ejerce una influencia positiva sobre la hipófisis, que produce una descarga de gonadotrofinas FSH y LH cuyos efectos son un incremento de la vascularización del ovario mediados por factores vasodilatadores como la histamina, bradiquinina, angiotensinas, prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas. En las paredes de los capilares se forman numerosas fenestraciones que permiten la salida del plasma y células sanguíneas del folículo, provocando un edema de la teca externa (Massimiliano, 2009).

Normalmente, en la vaca sólo un folículo ovula cada ciclo estrual. Alrededor del 10% de las veces ovulan dos folículos y es raro que ovulen tres. La ovulación ocurre en el ovario derecho alrededor del 60% de las veces; el 40% restante ocurre en el izquierdo (Hafez, 2002; Hincapie, 2005).

2.2.2.- Cuerpo lúteo

Como resultado de la ovulación se produce una hemorragia en la cavidad folicular, la misma que sufre un proceso de coagulación denominándose cuerpo hemorrágico, en donde se produce un infiltrado de eosinófilos y proliferación rápida de las células de la granulosa y teca, formándose el cuerpo lúteo por luteinización. A partir del día 3 a 4 del ciclo el cuerpo lúteo produce cantidades considerables de progesterona, el mismo que alcanza su peso (5 g) y tamaño (2 cm) máximo, así como la máxima producción de progesterona alrededor del día 11 del ciclo. Este es uno de los crecimientos más rápidos que se conoce en biología (Hincapie, 2005).

2.2.2.1.- Fisiología del cuerpo lúteo

Importantes recomposiciones y cambios morfológicos de las estructuras foliculares suceden luego de la ovulación, con actividad genérica autocrina y paracrina de los factores de crecimiento implicados en la proliferación local y remodelaciones tisulares necesarias para la transformación luteal de un folículo, en la que intervienen mecanismos biológicos, procesos inflamatorios, producción de progesterona y síntesis de proteasas y angiogénesis. Así, la rápida vascularización de los estratos celulares derivados de la granulosa a partir de los vasos que irrigan la teca es inducida por la actividad angiogénica del fluido folicular. Ésta depende de la FGF (Fibroblast Growth Factor), del IGF, del TGF- β , de la activina, de la inhibina y de la folistatina (Massimiliano, 2009).

El cuerpo lúteo está formado por células esteroideógenas grandes derivadas de las células de la granulosa y pequeñas derivadas de las células de la teca

interna. En los mamíferos ejerce una función esencial en la regulación del ciclo estrual y mantenimiento de la gestación (Massimiliano, 2009).

2.3.- Donantes de embriones

Aún no existe la vaca donante que sirva para complementar todas las exigencias requeridas por un ganadero o bien para adaptarse a la situación del mercado en cada momento, por lo que hay que tener en cuenta unos criterios generales que se puedan utilizar para incrementar el nivel genético Medio del rebaño y hacer de la TE una aventura rentable.

2.3.1.- Criterios genéticos de selección

Antes de superovular una vaca debemos conocer su capacidad de transmisión. En la actualidad se están superovulando muchas vacas que no cumplen con las cualidades genéticas requeridas para la transmisión de caracteres rentables a sus descendientes. Así muchas vacas, bajo la vista de su propietario, parecen de mayor valor genético que el que en realidad tienen.

- **Índice de vaca.** - Las ideas apuntadas anteriormente hacían pensar que la vaca más productora del rebaño era la mejor candidata como donante de embriones, esperando que tuviese el mayor índice genético para leche. Sin embargo, a pesar de existir una gran relación entre ambas (producción e índice) no tiene porqué ser así. La aparición y puesta a punto de la metodología BLUP-Modelo Animal nos permite obtener unos índices genéticos de vaca muy fiables y de gran valor para acometer, con criterios objetivos, la selección de nuestra vaca donante. Para obtener el índice genético de una vaca se incorporan los valores de su propia lactación, la de todos sus familiares y la de todas sus compañeras de rebaño, siendo todas las conexiones familiares utilizadas para estos cálculos. EL índice genético de una vaca nos indica lo que la vaca transmite a su descendencia, es decir, nos habla de la capacidad de producción que tendrán sus descendientes. Además, debemos considerar que cada lactación de una vaca posee unas circunstancias de producción distintas (manejo y alimentación, incidencia de enfermedades, número de lactación, intervalo entre partos, edad y mes

del parto), existiendo algunos factores que influyen en todas las lactaciones del animal pero que no se transmiten a la descendencia (mastitis, problemas de pezuñas, etc.). Todas estas circunstancias ambientales hacen que las producciones observadas de un animal no sean un criterio preciso para decidir qué animales son los candidatos más idóneos para ser sometidos a superovulación (Burnside, 1992).

2.3.2.- Criterios no genéticos de selección

Las donantes deben ser consideradas tanto de forma individual o como integrantes de un rebaño y por lo tanto condicionadas por el manejo que el ganadero realiza en su estancia. A la hora de decidir cuándo superovular, deberemos estudiar y valorar aquellos factores ligados tanto al individuo como al rebaño.

Criterios reproductivos. Una vez elegidas las hembras genéticamente superiores se ha de realizar una nueva selección bajo el punto de vista reproductivo, para lo cual se han de tener en cuenta diferentes extremos. Entre los más importantes se encuentran: Ausencia de antecedentes patológicos anteriores como abortos, retenciones placentarias y quistes, ya que reducen la probabilidad de una producción óptima de embriones. Es deseable que los animales propuestos para la superovulación no presenten una media superior a las 3 inseminaciones por gestación, si bien, en el caso de animales de gran valor, pueden ser utilizados como donantes; sin embargo, aunque la respuesta esperada puede reducirse al 50% de los animales y del número de embriones, estos serán igual de fértiles que los de los animales o “repetidores”. Ciclicidad anterior a la superovulación. Con el fin de tener la seguridad de que se ha restablecido la función ovárica normal, se deberán detectar 2-3 ciclos sexuales completos y regulares después del parto. Ello resulta en un intervalo parto superovulación mínima de 60-90 días, siendo el óptimo de 90-120 días (De la Fuente, Monge, Cocero y Barragan, 1988).

2.3.2.1.- Factores ligados a la vaca

a.- Edad. - En el ganado Brown swiss hasta los 7-8 años, la respuesta a la superovulación entra dentro de los parámetros normales, pero a partir de esta edad se inicia un descenso tanto en el porcentaje de vacas que responden al tratamiento, como en el número y porcentaje de embriones viables obtenidos. La edad óptima se sitúa entre los 2 y 5 años. Cuando las donantes son novillas, la superovulación se puede realizar a partir de los 14-15 meses, siempre que los animales presenten un buen desarrollo y condición corporal (De la Fuente, Monge, Cocero y Barragan, 1988).

b.- Estado fisiológico. - El estado fisiológico del animal (vacas en producción o secas), conlleva un manejo distinto en el rebaño, y una problemática diferente que tendremos que valorar para decidir el cuándo y el cómo de la superovulación. En las vacas en producción, el intervalo parto-superovulación mínimo dependerá inicialmente del estado reproductivo de la donante, por lo que podremos situarlo alrededor del día 60 post-parto, momento en el que el aparato reproductor debe estar en perfectas condiciones, además de haberse observado más de un celo a intervalos regulares. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los primeros meses después del parto la vaca se encuentra en una situación de balance energético negativo. En estas circunstancias los intentos de superovulación conducirán normalmente a la obtención de malos resultados, por lo que es necesario esperar a que los animales aumenten su capacidad de ingestión, recuperen peso y bajen el nivel de producción. Por lo anteriormente expuesto podemos situar el momento óptimo para la superovulación entre los 90 y 120 días, teniendo en cuenta que el ganadero desea generalmente dejar lo antes posible la vaca gestante, para no alargar excesivamente el intervalo entre partos. Cuando se trata de vacas secas, se sabe que en el período seco el principal problema es la falta de producción lo que puede llevar a un engrasamiento muchas veces excesivo, disminuyendo la efectividad del tratamiento y la calidad de los embriones obtenidos (Hafez, 2002).

c.- Ciclo estral. - el ciclo estral es un fenómeno rítmico, con periodos regulares pero limitados de receptibilidad sexual, asociados en la mayoría de los casos con la liberación de los óvulos capaces de ser fertilizados; el tiempo de duración del ciclo estral es de 21 días en promedio, se divide en 4 fases: estro, metaestro, diestro y proestro. Cada ciclo puede estar claramente dividido en una fase luteal y fase folicular (Hafez, 2002).

d.- Alimentación. - La alimentación de la donante, tanto en el período seco como en el postparto, va a ejercer una gran influencia en el intervalo parto superovulación, en el porcentaje de vacas que responden al tratamiento y en la cantidad y calidad de los embriones obtenidos. La donante debe alcanzar el nivel óptimo de condición corporal en el último tercio de la lactación, para mantener este estado durante el período seco y llegar al parto en buen estado corporal, pero nunca gordas ni flacas, con un nivel óptimo de puntuación de 3 en la escala de 1 a 5. La alimentación en el post-parto debe ser equilibrada y ajustada a sus necesidades fisiológicas y nivel de producción. El control de la alimentación de las donantes debe iniciarse mucho antes del inicio de la superovulación, ya que los errores cometidos incluso siete u ocho meses antes de la superovulación ejercerán una acción negativa sobre la respuesta superovulatoria (De la Fuente, Monge, Cocero y Barragan, 1988).

e.- Estrés. - Cualquier factor estresante influirá negativamente en la superovulación. Básicamente hay que evitar los cambios bruscos en el manejo, no realizar vacunaciones ni tratamientos preventivos de ningún tipo, así como evitar las superovulaciones en los meses de más calor (De la Fuente, Monge, Cocero y Barragan, 1988).

f.- Ganadero. - El ganadero es un factor de vital importancia, puesto que de él depende todo el manejo del rebaño; de su grado de competencia y confianza con el veterinario dependerá en gran medida el éxito de la TE. La detección de celos deberá realizarla de forma eficiente ya que de los celos depende el inicio de la superovulación, así como la inseminación de la donante y la posterior implantación de los embriones en las receptoras. Una deficiente detección de celos puede ser causante de la ausencia de

embriones viables el día de la colecta, así como de la carencia de gestaciones después de la transferencia. Hay que tener en cuenta que la preselección reproductiva intensa de los animales destinados a donar embriones es muy importante, pues disminuye la incidencia del número de hembras que no responden a los tratamientos superovulatorios y mejoran la respuesta media del número de embriones viables o transferibles de un programa de transferencia de embriones (De la Fuente, Monge, Cocero y Barragan, 1988).

2.4.- Superovulación de donantes

El fundamento de la transferencia de embrión radica en la sobreestimulación de los ovarios de la hembra donante para producir un elevado número de ovulaciones y así conseguir el mayor número de embriones fecundados y desarrollados en un solo ciclo sexual. Para alcanzar este fin es necesaria la utilización de hormonas gonadotropas exógenas. Entre ellas las más utilizadas son la gonadotropina del suero de yegua gestante (PMSG), la gonadotropina menopáusica humana (HMG) y la hormona folículo estimulante (FSH), de la cual existen numerosos productos en el mercado que proceden de diversos orígenes: Pluset, Folltropin, Ovagen y Stimufol. La variabilidad individual en la respuesta superovulatoria a las gonadotropinas exógenas es el factor limitante más importante que afecta a los resultados de la superovulación, de tal manera que los rangos de respuesta varían de 0 a 50 embriones, mientras que las tasas de viabilidad se sitúan entre el 0 y 100% de los embriones recogidos de una donante, independientemente de la hormona utilizada o de cualquier otra variable. Así pues, el objetivo principal de los tratamientos de superovulación es producir un gran número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez, sin embargo, la respuesta a estos tratamientos es muy variable y difícil de predecir. Se ha asociado la variabilidad en la respuesta ovárica con causas relacionadas con los tratamientos utilizados para inducir superovulación; las preparaciones hormonales los lotes de gonadotropinas, la duración del tratamiento, el momento del tratamiento con relación al ciclo estral, la dosis total de gonadotropinas y el uso de hormonas adicionales. También hay otros factores importantes que son inherentes al animal y a su ambiente, la historia

reproductiva Reproducción Bovina, la edad, la estación del año, la raza y el estado ovárico en el momento del tratamiento (Moor et al., 1985).

La edad óptima para la superovulación se sitúa en los 3-4 partos, descendiendo la respuesta embrionaria tanto en cantidad como en calidad a medida que aumenta la edad, encontrándose el punto de inflexión en los diez años, después de los cuales las respuestas comienzan a descender progresivamente a gran velocidad. Las gonadotropinas actúan sobre el ovario ejerciendo su influencia en el crecimiento folicular, modificando la multiplicación celular, el crecimiento del ovocito y el desarrollo del antrum: de esa forma, aumentan la salida de folículos primordiales del “pool” folicular y se reduce el número de folículos atrésicos. Se ha puesto de manifiesto que existe un efecto entre la dosis total de hormona gonadotrópica exógena y la producción de embriones. Inyectando altas dosis de PMSG encontraron un efecto inhibitorio de la respuesta, mientras que, por otro lado, se ha reportado una disminución en el número de embriones viables, aunque no en el total de embriones obtenidos, el cual no variaba entre dosis de 15 y 45 mg de FSH, sin embargo, decrecía significativamente a una dosis de 60 mg. El uso de la ultrasonografía ha permitido evidenciar definitivamente que existen ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral del bovino. Se ha demostrado que una onda de desarrollo folicular está constituida por el crecimiento de varios folículos antrales (4-5 mm. de diámetro) seguido por la selección de un folículo dominante y la regresión del resto de los folículos subordinados. En ausencia de regresión luteal el folículo dominante regresiona (se atresia) y da lugar a una nueva onda de crecimiento folicular. La identificación de los folículos individuales por medio del examen ultrasonográfico diario ha demostrado que la mayoría de las vacas exhiben dos o tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral (hasler et al., 1983).

Hacia la mitad de la onda folicular ovárica el folículo dominante, actuando local o sistémicamente, induce atresia de los restantes folículos en desarrollo. Por medio del examen ultrasonográfico se puede decidir el momento propicio para la iniciación del tratamiento en cada animal. En este sentido, se ha demostrado que la presencia de un folículo dominante en el momento del inicio del tratamiento disminuía la respuesta superovulatoria en un 40 a 50%, apreciando también una

alta correlación entre número de folículos menores de 5mm de diámetro y la respuesta superovulatoria. En términos generales, estos datos sugieren que debería esperarse una respuesta superovulatoria baja si los tratamientos son iniciados en presencia de un folículo dominante activo. Por el contrario, la presencia de folículos (3-6mm de diámetro) en la fase de crecimiento estaría asociada con una buena respuesta. En condiciones de campo, es difícil determinar, con un solo examen ultrasonográfico, si un folículo grande es funcionalmente dominante y si los folículos pequeños están en la fase de crecimiento activo o en la de atresia. No obstante, la presencia de más de seis o siete folículos de 3-6mm de diámetro junto a un folículo grande, 8 a 10 días después de la ovulación, da evidencias de que está comenzando una nueva onda folicular (Mariana, 1980).

Los tratamientos superovulatorios se inician generalmente entre los días 8 a 12 del ciclo estral (celo = día 0). Este momento de iniciación del tratamiento se basó originalmente en la teoría de que en este momento comenzaba a madurar una onda de folículos. Se demostró que podía alcanzarse una respuesta superovulatoria mayor si los tratamientos estimuladores se iniciaban el día 9 del ciclo, comparada a la que se obtenía comenzando en los días 3, 6 ó 12. Estas observaciones han sido corroboradas por recientes evidencias ultrasonográficas que muestran que la segunda onda folicular comienza, en promedio, el día 9.5 del ciclo en las vacas de tres ondas y el día 10.5 del ciclo, en las de dos ondas. Se ha demostrado que tanto la tasa ovulatoria como el número de embriones viables producidos son caracteres relativamente inherentes a cada vaca donante. Los animales que tienen una respuesta baja en un tratamiento, probablemente continuarán en la misma forma en los tratamientos consecuentes y los animales que responden bien inicialmente continuarán haciéndolo en esta forma (Moor et al., 1985).

Generalmente se acepta que la estimulación con FSH resulta superior a la realizada con PMSG, a pesar de la variación en la relación FSH: LH de los preparados de FSH, que se ha demostrado afecta a la producción embrionaria. Para evitar el efecto pernicioso originado por la larga vida media de la PMSG se han utilizado anticuerpos monoclonales anti-PMSG con lo que se consiguieron respuestas similares a las obtenidas con FSH. Una mención aparte merece las

experiencias danesas en las que FSH, PMSG y anti-PMSG ofrecen un idéntico número de embriones viables. El incremento del número de embriones viables obtenidos de un mismo animal puede conseguirse mediante la realización de superovulaciones consecutivas. Dependiendo del intervalo de tiempo transcurrido entre ellas y de la variabilidad individual, se puede mantener la respuesta total de embriones, aunque descienda ligeramente el número de embriones viables, lo cual hace descender significativamente la tasa de viabilidad. En la práctica totalidad de los programas de superovulación se realizan dos inseminaciones artificiales sobre la hembra superovulada, sin embargo, se ha puesto de manifiesto que una sola inseminación produce el mismo número de embriones viables (Mariana, 1980).

2.5.- Manipulación de embriones

2.5.1.- Obtención de embriones

Entre el sexto y octavo día (día 0 = día del celo) se procede a la obtención de los embriones producidos, ya que antes de este momento algunos embriones pueden permanecer aún en los oviductos. Actualmente se utilizan catéteres de obtención transcervical (Foley, Rusch), provistos de un balón insuflable en su extremo que permite crear un compartimiento estanco en la parte distal del cuerno uterino y proceder al arrastre de los embriones allí localizados. El medio de arrastre más utilizado es una solución tampón fosfato-salina (PBS: ajustado a pH=7 y POsm. 280 mOsm/K), suplementado con antibióticos y proteínas (Newcomb, Rowson and Trounson, 1976).

2.5.2.- Evaluación de embriones

Después de recuperado el medio de lavado los embriones deben ser aislados del volumen total utilizando diversos métodos de filtración y drenaje, para poder realizar su evaluación morfológica y determinar su utilización posterior. Según los criterios descritos en 1990 en el Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 2000), los embriones han de ser catalogados de acuerdo a su estadio de desarrollo, nombrándoles del 1 (estadio de una célula) al 9 (estadio de blastocisto

eclosionado), y según su calidad: excelente (1), bueno (2), regular (3) y degenerado (4).

“De acuerdo a las normas de la International Embryo Transfer Society (IETS), la clasificación de los embriones en función de su estadio de desarrollo se efectúa de manera numérica de la siguiente manera

Clasificación de los embriones según normas IETS.

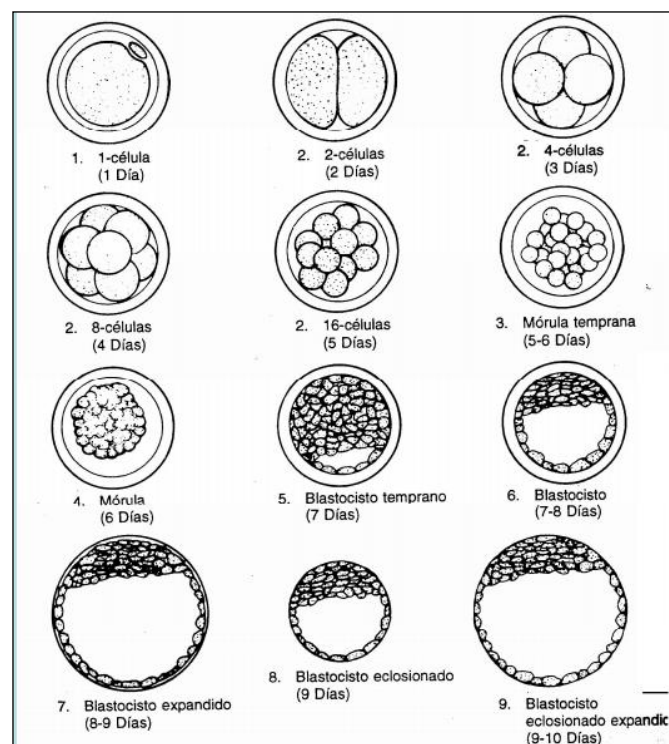


Figura 1: Clasificación de los embriones (De la Fuente J, 1989)

Valoración morfológica según IETS.

Los estados de desarrollo del embrión se identifican, después de tener 16 células, de acuerdo al desarrollo morfológico.

Mórula (Estadio 4): Las células (blastómeras) son difíciles de distinguir unas de otras. El embrión tiene aproximadamente 5 días.

Mórula compacta: Las blastómeras se juntan y forman una masa celular sólida. El embrión ocupa aproximadamente un 60% del espacio perivitelino.

Blastocisto temprano (Estadio 5): Presenta una cavidad en donde se encuentra un fluido llamado blastocele. El embrión ocupa el 70-80% del espacio perivitelino. Se puede diferenciar el trofoblasto y el macizo celular interno.

Blastocisto (Estadio 6) propiamente dicho. La única diferencia entre estos dos estados es básicamente el tamaño de la cavidad.

Blastocisto expandido (Estadio 7): El diámetro aumenta hasta en un 150%. La zona pelúcida se adelgaza hasta un 66% con respecto al grosor que tenía en el Estado 4. Estos embriones tienen una edad estimada de 8 a 9 días.

Blastocisto eclosionado (Estadio 8): La masa celular puede estar por fuera de la zona pelúcida o en proceso de salir. Luego viene un estado llamado Blastocisto eclosionado expandido (Estadio 9).

El grado de desarrollo de un embrión se determina por números en donde el número 1 identifica un oocito sin fertilizar, el número 2 nos identifica un embrión con hasta 16 células (2 a 5 días). El número 3 identifica una mórula temprana y los números del 4 al 9 nos identifican embriones que ya presentaron compactación. En un lavado convencional los embriones son colectados entre los días 6 y 8, o sea entre mórula y blastocisto. Clasificación según su estado de desarrollo son los siguientes:

Estado 1: Infertilizado

Estado 2: de 2 a 16 células

Estado 3: Mórula temprana

Estado 4: Mórula

Estado 5: Blastocisto temprano

Estado 6: Blastocisto

Estado 7: Blastocisto expandido

Estado 8: Blastocisto eclosionado

Estado 9: Blastocisto eclosionado en expansión

Hasta aquí se vio la clasificación de los embriones según su estado. Ahora veamos la calificación que le damos a los embriones de acuerdo a su calidad.

La evaluación la damos de acuerdo a sus características morfológicas. Estas características son subjetivas y pueden variar de un técnico a otro. Las características que debemos tener en cuenta para calificar un embrión son:

- a. Forma del embrión
- b. Color y textura de la masa celular
- c. Diferencia de tamaño entre las blastómeras
- d. Número y nivel de compactación de las blastómeras
- e. Presencia de blastómeras sueltas o separadas
- f. Forma y estado de la zona pelúcida

La clasificación según su calidad de los embriones Palma (2008):

Calidad 1: excelentes. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniforme, simétricos, de forma esferoide y la zona pelúcida está intacta.

Calidad 2: bueno, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular, Su forma puede ser ligeramente irregular.

Grado 3: regular, el embrión posee varios defectos: forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento en la zona pelúcida.

Grado 4: malo, el embrión posee muchos defectos: los correspondientes al grado 3 más desarrollo retardado, sería ruptura de la zona pelúcida el embrión puede encontrarse parcialmente fuera de ella, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o fragmentación de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y clara degeneración.

Una vez que se ha realizado el diagnóstico morfológico y se han determinado aquellos embriones capaces de proseguir su desarrollo, se

puede proceder a su manipulación para posteriormente ser transferidos a hembras receptoras. En la actualidad, en condiciones de campo, se puede llevar a cabo la conservación, congelación y partición de los embriones. Cuando se dispone de un laboratorio adecuado se puede llegar incluso a determinar el sexo.

2.6.- Selección de receptoras

El diagnóstico más fiable de la viabilidad embrionaria es la gestación y el parto de la hembra receptora, además de ser el objetivo último de cualquier técnica artificial de reproducción. Existen una serie de factores que conciernen al tipo de técnicas empleadas para la transferencia y sincronización entre donantes y receptoras, al embrión y a la receptora, que son los que determinan el éxito o el fracaso del conjunto de la transferencia de embriones.

2.6.1.- Características de las receptoras

Diversos factores han de ser tomados en cuenta a la hora de seleccionar animales para organizar un lote de futuras receptoras de embriones, entre otros los más importantes a considerar son:

a.- Edad. - La utilización de novillas como receptoras frente a vacas ofrece superiores tasas de gestación (53% vs 71%), mayor facilidad de manejo por su uniformidad y menor costo. Deben ser seleccionadas aquellas novillas que ciclen normalmente y hayan alcanzado un 45-55% de su peso adulto, con un buen desarrollo y condición corporal (Broadbent, StewartM y Dolman, 1991).

b.- Nutrición. - El aporte energético y una condición corporal adecuada (de 2 a 3) son los principales factores que condicionan el éxito en la consecución de la gestación. Las receptoras deben estar en un estado positivo de energía y la ración en todos sus componentes (proteína, energía, minerales, vitaminas, etc.) debe ser equilibrada. En caso contrario habrá que suplementar hasta satisfacer las necesidades de cada animal. Cualquier cambio deberá realizarse gradualmente, siendo recomendable mantener a las posibles receptoras con la misma dieta por lo menos desde

6 semanas antes de la transferencia y mantenerla hasta los dos meses de gestación.

c.- Estrés. - El estrés puede interferir en casi todos los aspectos de la reproducción, tales como el celo, la ovulación, el desarrollo embrionario y la gestación. En la receptora, muchas pueden ser las causas de estrés, como climáticas, nutricionales y en muchas ocasiones el trato recibido por el ganadero. En el manejo de las receptoras se ha de evitar en lo posible cualquier factor estresante, así; en el rebaño de receptoras se debe mantener su composición y tamaño para evitar todo conflicto y trastorno de la conducta estral que impida la identificación del animal en celo. Los locales habrán de disponer de condiciones apropiadas, instalaciones cómodas y elementos de sujeción seguros para su manejo. El acostumbamiento de los animales al manejo que recibirán el día de la transferencia favorecerá el incremento de las tasas de gestación.

2.6.2.- Sincronización de receptoras

El embrión, al ser transferido, ha de encontrar un ambiente uterino lo más similar posible al que soportaba en el animal donante. El sistema utilizado normalmente para conseguir este propósito consiste en la sincronización de celos entre donante y receptora, tratando de hacer coincidir lo mejor posible el estadio de desarrollo embrionario con su correspondiente estado uterino, siendo el margen de desequilibrio aceptable de ± 1 día (Seidel, 1980) para que no represente un efecto adverso.

Para la sincronización de celos de las receptoras existen actualmente en el mercado los análogos de prostaglandina F_{2a} y los progestágenos. Las receptoras a las cuales para su sincronización con la donante se les administró PGF_{2a} (con o sin progestágenos), presentaron tasas de gestación significativamente superiores a las que fueron utilizadas tras la observación de un celo natural (Hasler et al., 1987).

2.6.3.- Transferencia

Una vez que se ha detectado perfectamente el celo, siete días después se procederá a la implantación del embrión. La palpación de un cuerpo lúteo (CL) de buena calidad es el método habitual de evaluación de la aptitud de la receptora. Al realizar la exploración rectal de las receptoras se califican los cuerpos lúteos de 1 a 3 según su tamaño y configuración. Debido a las relaciones entre embrión y ovario, los porcentajes de fertilidad aumentan al depositar los embriones en el cuerno del ovario activo, ipsilateral, llegando a incrementar hasta en 50% el número de receptoras gestantes. Un último factor a tener en cuenta en la transferencia a las receptoras es el factor humano, de tal manera que las tasas de fertilidad variaron del 20% al 67% según la habilidad de cada técnico. Así pues, la experiencia del operador es fundamental no solo en la palpación, sino en la transferencia para evitar cualquier daño a la receptora y así conseguir el mayor número de gestaciones (Seidel, 1980).

2.6.4.- Transmisión de enfermedades

Ante la posibilidad de introducir mediante la TE enfermedades en zonas o rebaños sanos, todos los agentes patógenos han de ser considerados, por lo que actualmente 50 agentes han sido o están siendo investigados. La mayoría de ellos afectan a la especie bovina, aunque algunos son específicos de los pequeños rumiantes y del porcino. El embrión no es un buen hospedador de gérmenes, ya que posee una triple protección del medio ambiente: el cuerpo maternal, la cavidad uterina y la zona pelúcida. No obstante, se encuentra sometido a una serie de riesgos de contaminación que pueden provenir de los gametos iniciales (aunque esta posibilidad nunca ha sido demostrada) y que pueden suceder desde la fertilización hasta la transferencia. En el ambiente uterino los embriones se encuentran en el tracto genital femenino después de una fase estrogénica elevada que promueve la movilización de los mecanismos de defensa contra patógenos. Dado el reducido tamaño del embrión y su movilidad limitada se reducen las posibilidades de exposición a los agentes patógenos, no existiendo al inicio entre 6 y 9 días de gestación, ningún

intercambio directo ni gaseoso ni metabólico entre el embrión y el ambiente uterino. Por último, la zona pelúcida, cuando está intacta, al ser una membrana no celular actúa a manera de barrera física para bacterias y virus que no podrán penetrarla, aunque podrían acompañarle en la recogida y posterior transferencia. En los últimos años se han realizado numerosos estudios para determinar la capacidad de los embriones para transmitir enfermedades. La mayoría se han realizado exponiendo “in vitro” a los embriones al patógeno u obteniendo los embriones de donantes infectadas, para posteriormente ser analizados “in vitro” o transferidos a receptoras sanas. Generalmente los embriones se han expuesto “in vitro” a concentraciones muy superiores a las que podrían verse expuestos “in vivo” en las condiciones más extremas; de igual manera, se han obtenido embriones de donantes virémicas y clínicamente enfermas, lo cual no sería en absoluto frecuente en la práctica, de tal forma que, si el agente patógeno no es transmitido en esas condiciones, resulta muy improbable que lo sea por medio de embriones procedentes de donantes seropositivas (Thibier, 1987).

La posibilidad de contaminación a partir de la obtención dependerá de la asepsia en los métodos y la esterilidad de los medios y materiales utilizados para manipular “in vitro” los embriones.

2.7.- Criopreservación de embriones

La criopreservación consiste en la conservación de material celular, tejidos u órganos a temperaturas bajas, normalmente a temperatura del nitrógeno líquido (N₂L; -196 °C), para detener completamente las reacciones biológicas, teniendo como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de éstos. Sin embargo, no es un proceso exento de problemas, ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas que pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Ávila et al., 2006).

La mayoría de las células mamíferas mueren cuando se exponen a bajas temperaturas, a menos que previamente hayan sido expuestas a una solución que

las proteja (crioprotectores) y a rangos de enfriamiento y calentamiento específicos (Shaw et al., 2000).

Los protocolos de criopreservación han sido clasificados como “lentos o rápidos”, de acuerdo con la velocidad de enfriamiento y el tipo y concentración de los crioprotectores usados. Sin embargo, los principios y objetivos de la criopreservación son aplicables a ambos: proteger de los efectos del enfriamiento y congelación, evitar la formación de hielo intracelular y proteger de los daños tóxicos de los crioprotectores a temperaturas bajas (Parks y Ruffing, 1992).

2.7.1.- Principios básicos de la criopreservación

La criopreservación de material biológico se realiza usualmente en una solución acuosa con diferentes solutos presentes. Las propiedades físico-químicas que rigen los eventos a los cuales está sometida la solución durante la congelación, resultan de la concentración de solutos disueltos en ella (Vila, 1984).

El punto de congelación de la solución es inversamente proporcional a la concentración de solutos presentes (Vila, 1984). Cuando una suspensión celular es enfriada y alcanza temperaturas entre -5 y -10 °C se forman núcleos de hielo distribuidos aleatoriamente en el medio extracelular que darán lugar a regiones en fase cristalina. El hielo en el espacio extracelular coexiste con el agua líquida intracelular gracias a la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula. Cuando en el medio extracelular ocurre la cristalización se forma hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida a medida que el cambio de fase progresa. De manera que las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico (Boiso, 2001).

En un proceso programado de enfriamiento, a medida que el sistema de refrigeración extrae calor, la temperatura baja hasta que, alcanzado el punto eutéctico, la fase líquida remanente y los solutos se solidifican. El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede

alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos solidifiquen conjuntamente. Se denomina sobreenfriamiento (supercooled) a un estado metaestable, en el que la suspensión celular enfriada lentamente alcanza temperaturas por debajo de su punto de cristalización manteniéndose sin embargo en estado líquido. El agua intracelular sobreenfriada, fluye hacia afuera en respuesta a la diferencia de potencial que se crea entre el medio intra y extracelular. Al ocurrir la cristalización, durante la transición de una a otra fase hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Este eleva transitoriamente la temperatura de la muestra. Como el sistema de refrigeración continúa extrayendo calor y la temperatura de la cámara continúa descendiendo, la muestra rápidamente se enfría. Sin embargo, este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células. Para evitar los efectos dañinos del sobreenfriamiento, se realiza la inducción de nucleación de cristales (seeding) a una temperatura ligeramente superior que la nucleación espontánea de la solución (Grossmann y Santaló, 1991).

2.7.2.- Influencia de la velocidad de congelación

Cuando la cristalización ocurre en el medio extracelular los solutos se hacen progresivamente más concentrados en la fracción líquida haciéndolo hipertónico, a medida que el cambio de fase progresa. En respuesta a la diferencia de gradiente que se genera entre el medio intra y extracelular, el agua fluye hacia afuera. Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular. Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiéndose llegar al colapso celular. Con una velocidad de enfriamiento adecuada, la célula se deshidratará y concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente el daño celular se minimizará (Mazur, 1984). Por tanto, la supervivencia celular a

la congelación será máxima a una velocidad de enfriamiento óptima, que es específica para cada tipo celular.

2.7.3.- Crioprotectores de los embriones

Los crioprotectores (CP) son sustancias utilizadas para la protección de células o tejidos del daño que se produce durante el proceso de congelación y descongelación debido principalmente a la formación de hielo.

Los CP alteran las propiedades físico-químicas de las soluciones. Son moléculas hidrosolubles y de baja toxicidad que actúan disminuyendo el punto eutéctico de las soluciones (disminuyen la temperatura a la que se produce la transición del agua de estado líquido a sólido) interactuando con las moléculas de agua al reducir su capacidad de formar enlaces entre ellas. También actúan estableciendo puentes de hidrógeno con otras moléculas biológicas evitando que pierdan su estructura fisiológica original y por lo tanto su viabilidad. En la CPE se utilizan dos tipos de CP: permeables o no permeables, según tengan o no capacidad para atravesar la membrana celular (Celestinos y Gatica, 2002).

2.7.3.1.- Crioprotectores permeables

Los CP permeables, debido a que tienen un bajo peso molecular, son capaces de atravesar la membrana plasmática de forma activa o pasiva (Shaw et al., 2000). Entre estos se encuentra el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el 1 -2 propanodiol, etilenglicol (EG), el propilenglicol, el polietilenglicol, el etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma. De todos, el EG es el CP permeable más utilizado para la vitrificación de embriones debido a su baja toxicidad celular y a su rápida capacidad de difusión a través de la membrana plasmática y el que tiene mayor permeabilidad es el etilenglicol comparado con el propilenglicol y el glicerol (Palasz y Mapletoft, 1996).

2.7.3.2.- Crioprotectores no permeables

Los CP no permeables o extracelulares, son compuestos de alto peso molecular que normalmente se utilizan asociados a agentes CP permeables. Estos ejercen su efecto crioprotector promoviendo una rápida deshidratación celular aumentando el gradiente osmótico y ayudando indirectamente a la incorporación por parte de las células del CP permeable. Los más comúnmente utilizados son los azúcares como la sacarosa, aunque también se emplean macromoléculas como al polivinilpirrolidona (PVP), ficol, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, rafinosa y proteínas de alto peso molecular (Kuleshova et al., 1999).

2.8.- Vitrificación

La vitrificación (VT) se define como la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado vítreo sólido sin la formación de cristales (Kuwayama, 2007). Esta técnica requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas (superiores a 23000 °C/min) y elevadas concentraciones de crioprotectores de 5 a 7 M (Vajta, 2000; Kuwayama, 2007).

Para obtener buenos resultados al vitrificar embriones se deben tomar en cuenta los siguientes factores: volumen de la muestra, concentración de crioprotector, método de adición, temperatura y tiempo de equilibrio, solidificación, tasa de enfriamiento y cambios en el volumen (Arav et al., 2000), ya que éstos están estrechamente relacionados con la permeabilidad y la toxicidad del crioprotector (Ushijima y Kuwayama, 2004).

El máximo daño en el embrión durante el enfriamiento ocurre de -15 a -16 °C debido a la fase de transición de la membrana lipídica. Esta fase se ve afectada por la fusión de los liposomas afectando el termocomportamiento de las membranas en la transición de líquido a gel y la velocidad de penetración de los crioprotectores. El daño celular incluye pérdida de microvellosidades, alteración de la membrana plasmática, cambios mitocondriales, hinchamiento del retículo endoplásmico, pérdida de uniones entre células, así como fractura de zona pelúcida. Sin embargo, con la VT estos daños son mínimos ya que los embriones

pasan la fase de -15 a -16°C rápidamente. Para lograr que la velocidad de enfriamiento sea suficientemente rápida para evitar la formación de cristales de hielo, es necesario que el volumen a vitrificar sea lo más pequeño posible (Kuwayama, 2007).

Cuando las células son sumergidas directamente en N₂L, éste se calienta por el contacto con la célula, produciendo una capa de vapor que la rodea, aislando la muestra y evitando así, el intercambio térmico entre la muestra y el N₂L. Dicho proceso provoca la disminución de la velocidad de enfriamiento de la célula. Por lo tanto, para prevenir esta disminución en la velocidad de enfriamiento, la muestra a vitrificar deberá estar contenida en el menor volumen permitido para así tener una mayor superficie de contacto con el N₂L.

Mientras que Bejar and Gatus (2002), menciona que las pajillas sean enfriadas previamente en los vapores de nitrógeno líquido durante 2 minutos disminuyendo la cantidad de fracturas en la zona pelúcida de los embriones.

2.9.- Descongelación de los embriones

Los protocolos de desvitrificación deben tratar de disminuir la probabilidad de recristalización mediante una adecuada transferencia térmica. El método de desvitrificación más común para embriones es un método rápido y directo (Mucci et al, 2006). Durante la descongelación el rápido influjo de agua al interior de la célula, pueden causar un choque osmótico, cuya sensibilidad por la célula es dependiente de la permeabilidad de la célula al agua y los solutos, y que puede ser reducido por el uso de un buffer osmótico, no tóxico e impermeable como la sucrosa. La tasa de calentamiento óptima depende de los crioprotectores y su concentración, al igual que la tasa de congelación utilizada.

Para descongelar una muestra vitrificada, se sumerge el soporte de vitrificación en un medio a temperatura fisiológica ($37,5 - 39^{\circ}\text{C}$), obteniendo velocidades de calentamiento entre 3000 a 8000 $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, dependiendo del soporte utilizado. Los embriones son puestos en una solución para calentamiento entre 20°C a 37°C , para posteriormente rehidratarlos y remover los crioprotectores utilizados (Mucci et al., 2006).

2.10.- Diagnóstico de preñez

2.10.1.- Diagnóstico de preñez mediante palpación transrectal

Es el método ideal dado que no sólo permite establecer un diagnóstico relativamente precoz, sino también comprobar el estado funcional de los órganos genitales y sus alteraciones patológicas.

Se basa en las modificaciones de forma, dimensiones y situación del útero, la percepción de las membranas y líquidos fetales, los placentomas, el desarrollo de las arterias uterinas y en la percepción del frémito arterial (Cabodevila, 2007).

En el diagnóstico de preñez mediante palpación transrectal existen algunos signos cardinales, es decir sin ellos no puede confirmarse una gestación. Ellos son:

- La existencia de la vesícula amniótica.
- La presencia de las membranas embrionarias y fetales comprobada en forma de “doble pared”.
- La presencia del feto o de diferentes partes del mismo.
- La existencia de los placentomas.

Cada uno de estos signos como tal, es suficiente para el diagnóstico de preñez y también para estimar aproximadamente la edad de la misma. Los demás signos, aunque tienen también valor diagnóstico, hay que considerarlos complementarios de los signos cardinales. La preñez puede ser diagnosticada a partir de los 35 días. Es más fácil en vaquillonas dado que en vacas multíparas los órganos están más distendidos y se requiere de más atención (Cabodevila, 2007).

A continuación, se presenta una síntesis de los signos palpables durante la gestación:

30 días: La vesícula amniótica es esférica, presenta un diámetro de 2 cm. Se encuentra fijada en la parte anterior del cuerno uterino y puede ser

percibida como un pequeño abultamiento que da la impresión de un huevo de paloma. Hay que tener presente que la maniobra que se realiza para percibir este signo puede traumatizar tanto al embrión como a la vesícula amniótica, ocasionando la interrupción de la gestación. Por ello, se justifica su aplicación únicamente cuando el que diagnostica tiene amplia experiencia y posee una técnica muy refinada (Cabodevila, 2007).

60 días: El cuerno gestante es netamente fluctuante y la asimetría de los cuernos uterinos se hace evidente. Las membranas fetales se perciben pellizcando la curvatura mayor del cuerno uterino entre el pulgar y el índice y dejándola escapar poco a poco entre los dedos. Las envolturas son así percibidas, de la misma forma como se percibe “una camisa a través de la manga del saco”. Este signo es más fácilmente detectable en las primíparas que en las múltíparas (Cabodevila, 2007).

2.11.- Suplementación en su alimentación a vacas donantes y receptoras

2.11.1.- Maralfalfa

Maralfalfa (*Pennisetum* sp) es una gramínea con una alta capacidad de producción de forraje de buena calidad nutricional y que, al tratarse de un pasto de corte, permite incrementar la producción por hectárea (Ramírez, 2003). Esto es bastante importante toda vez que ha sido establecido que la carga animal es quizás uno de los factores más determinantes en la productividad de los sistemas de lechería especializada de tal manera que a mayor capacidad de carga, mayor es la rentabilidad del hato (Osorio, 2004).

El origen del pasto Maralfalfa (*Pennisetum* sp) es aún muy incierto. Existen varias hipótesis al respecto entre las que se encuentra la del sacerdote Jesuita José Bernal Restrepo (1979) quien aseguraba que fue el resultado de la combinación de varios recursos forrajeros entre los cuales están el pasto elefante (*Pennisetum purpureum*), una grama nativa (*Paspalum macrophyllum*), el gramalote (*Paspalum fasciculatum*), la alfalfa peruana (*Medicago sativa*) y el pasto brasilero (*Phalaris arundinacea*). Sostenía, además, que este pasto fue una creación suya

resultado de la aplicación del denominado Sistema Químico Biológico (S.Q.B), desarrollado por este mismo autor y que es propiedad de la Universidad Javeriana. Los fundamentos y la metodología que sigue el SQB no son descritos por Bernal (1979) lo que le resta seriedad y credibilidad a sus publicaciones.

2.11.2.- Pasto maralfalfa en el Perú

El controvertido pasto maralfalfa, luego de más de un año de evaluaciones preliminares ha comenzado a ser producido en la región san Martín (nororiente del Perú), este material ha sido introducido desde cali-colombia por la AERAM (ASOCIACION EDUCATIVA REFORMADA DEL ALTO MAYO).

Este Pasto ha sido sembrado para pruebas de producción en terrenos de alto mayo, con diferentes resultados que llevan a la conclusión que prospera muy bien en suelos de alta fertilidad, y que para llegar a producir niveles mayores de materia seca y nutrientes, necesita una corrección de la acides de los suelos y un abonamiento inicial y por cada corte, que se puede hacer con el mismo guano del ganado y un buen manejo en la edad del corte, también es exigente en riego, por lo tanto no prospera en suelos predominantes de la zona sin abonamiento.

2.11.3.- Características generales de la maralfalfa

Con la Maralfalfa se ha logrado obtener entre 1.000 y 1.400 g. de ganancia diaria en peso, a base de Maralfalfa, agua y sales minerales a voluntad, disminuyendo el consumo de concentrados. Es consumible por el ganado bovino, ovino, caprino, caballar, mular y hasta porcino (Osorio, 2004).

- Alto nivel nutricional.
- Es un pasto suave y de excelente gusto para el ganado.
- Su contenido en azúcares substituye la adición de melazas en la dieta rutinaria.

- Su floración es similar al trigo.
- Sus tallos son blandos y la planta se aprovecha al 100%.
- Se puede suministrar fresco, seco o ensilado.

2.11.4.- Usos de la maralfalfa

Suministrar al ganado, fresco, ensilado o secado por 2 o 3 días antes de picarlo. Recomendable para bovinos, equinos, caprinos y ovinos. Además, se ha ensayado exitosamente en aves y cerdos (Osorio, 2004).

2.11.5.- Análisis de contenido nutricional

Cuadro 1. Análisis nutricional de la maralfalfa.

| | | | |
|---------------|--------|---------------------|--------|
| Humedad | 79.33% | Proteínas crudas | 17.20% |
| Cenizas | 13.50% | Calcio | 0.80% |
| Fibra | 24.33% | Magnesio | 0.29% |
| Grasa | 2.10% | Fósforo | 0.33% |
| Carbohidratos | 12.20% | Potasio | 3.38% |
| Nitrógeno | 2.60% | Proteína digestible | 7.43% |
| | | Total, nitrógeno | 63.53 |

Fuente, (Osorio, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el establo Santiago, que está ubicado a 2 km. al oeste de la ciudad de Puno con latitudes de E 390251.01, S 8244983.5 y a una altura de 4108 msnm. Departamento de Puno, Provincia de Puno, Distrito de Puno y Sector Carmen de Cancharani.



Figura 2: Ubicación geográfica del establo Santiago.

3.2.- Material experimental

3.2.1.- Duración del periodo experimental

Para desarrollar la parte experimental de este trabajo de investigación, en primer lugar fue necesario un tiempo de 160 días calendario con la finalidad de desarrollar los procesos referente a la superovulación, lavado, búsqueda y clasificación de embriones, embasamiento en pajuelas de 0.25 ml y vitrificación, el mismo que fue aplicado con mucha responsabilidad que exige esta biotecnología y finalmente la transferencia de los embriones a receptoras y la evaluación de gestaciones en las receptoras.

3.2.2.- Vacas donadoras de embriones

Se tuvo 3 vacas donadoras de embriones de la raza Brown Swiss PPC, con edades promedio de 5 años, condición corporal de 3.5, ciclo estral normal, que no ha presentado retención de placenta en su vida útil, adaptadas a la altura y tienen una buena producción de leche por campaña/año. Los mismos que son de propiedad del establo Santiago.



Donadora 1 Gloria



Donadora 2 Lulu



Donadora 3 Dorina

Figura 3: Donadoras de embriones.

3.2.3.- Vacas receptoras de embriones

Se tuvo 12 vacas criollas las que recibieron los embriones con edades de 2 a 6 años, condición corporal de 2.5 a 3.5, ciclo estral normal, que no hayan presentado retención de placenta en su vida útil, con buenos índices de producción de leche. Identificadas en números de 1 al 12, cuya procedencia fueron: 6 vacas del establo Santiago Puno, y 6 vacas del Centro Poblado de Collacachi Puno.

3.2.4.- Pajillas de semen

Las pajillas de semen que se utilizó son de un TORO DEL CENTRO GENÉTICO SAN SIMÓN QUILMANA – CAÑETE.

- **SS SCIPIO CARTON SOLITARIO** REG. 11937



Figura 4: Catalogo del toro solitario.

3.2.5.- Sistema de crianza y alimentación de las vacas donadoras

Las vacas donadoras de embriones tuvieron un sistema de crianza mixta durante el tratamiento de superovulación, en donde las vacas durante el día se pastaron en pastos naturales en base a chilligua y bofedales, y por las tardes se instalaron en el establo para complementar su dieta con heno de avena picada mezclado con maralfalfa picada. Esto ayudo a cubrir en lo posible el requerimiento nutricional de las vacas donadoras.

Las vacas receptoras de embriones tuvieron un sistema de crianza extensiva y con una alimentación en base a pastos naturales como es la chilligua y bofedales, para no alterar su crianza natural y producir un estrés en las vacas que podría producirse un aborto.

La utilización del pasto maralfalfa en su alimentación de las vacas donadoras de embriones fue porque el establo Santiago está ubicado a una altitud de 4108 msnm. en donde no prospera muy bien la alfalfa u otros pastos cultivados, es por ello que se instaló este pasto maralfalfa bajo invernadero llegando a una altura de producción de entre 2 a 3 metros de altura en 70 días en promedio y que es utilizado para la alimentación de las vacas Brown Swiss donadoras de embriones.

3.3.- Método de producción de los embriones y sincronización de receptoras

3.3.1.- Superovulación e inseminación de las donantes de embriones

Como donantes de embriones se tuvo vacas de la raza Brown Swiss de 5 años de edad. Las donadoras fueron sincronizadas por medio de un dispositivo intravaginal (CIDR) con un contenido de 1.9g de progesterona se inició el día 08 de febrero donde se puso CIDR y 2.5 ml de benzoato de estradiol.

El tratamiento de superovulación fue iniciado el día 12 de febrero utilizando FSH (PLUSET) reconstituida según las indicaciones del proveedor y de acuerdo al siguiente esquema:

- Día 12: 2.5 ml por la mañana, 2.5 ml 12 horas después
- Día 13: 2 ml por la mañana, 2 ml 12 horas después
- Día 14: 1.5 ml por la mañana, 1.5 ml 12 horas después
- Día 15: 1 ml por la mañana, 1 ml 12 horas después

En el día 14 las donantes recibieron también 6 ml de lutalyce (análogo de prostaglandina F2alfa), y el CIDR fue retirado el mismo día, el día 16 de febrero se realizó la detección de celo durante 30 minutos por la observación de la conducta de monta. Aquellos animales que mostraron celo recibieron inseminación artificial a las 8 horas, 10 horas y 12 horas de iniciado el celo.

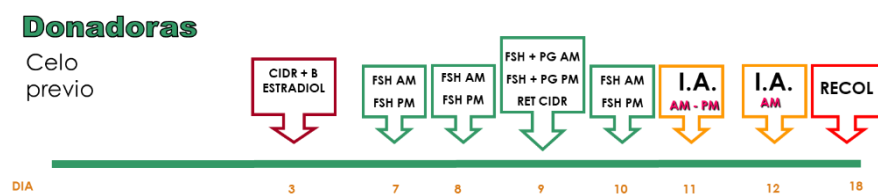


Figura 5: Protocolo de superovulación de vacas donadoras.

La técnica de la inseminación artificial que se aplicó fue de cuernos uterinos (Ortiz y Calderon, 2001) esta técnica se desarrolló de la siguiente manera:

- Determinación del ovario a ovular, que se realizó por el método de palpación rectal, horas antes de la inseminación artificial previa detección del celo, determinando el ovario funcional y desarrollo folicular, esto es permitido por el tamaño usual del folículo maduro que suele ser de 1 a 2.5 cm. de diámetro en su desarrollo máximo.
- Momento de la inseminación artificial fue entre 8, 10 y 12 horas consecutivas de iniciado el celo, para poder lograr la mayor cantidad de embriones fecundados.

3.3.2.- Sincronización de receptoras

Las receptoras de los embriones se dividieron en dos grupos, primer grupo para el protocolo 1 (propilenglicol + glicerol) y el segundo grupo para el protocolo 2 (etilenglicol + glicerol).

Primer grupo:

01 de marzo: aplicación de benzoato de estradiol 2 ml y CIDR

05 de marzo: aplicación de la hormona folligon 2 ml.

08 de marzo: aplicación de prostaglandina 5ml. Y retiro del CIDR.

09 de marzo: detección de celo de las vacas

16 de marzo: transferencia de embriones

Segundo grupo:

08 de marzo: aplicación de benzoato de estradiol 2 ml y CIDR

12 de marzo: aplicación de la hormona folligon 2 ml.

15 de marzo: aplicación de prostaglandina 5ml. Y retiro del CIDR.

16 de marzo: detección de celo de las vacas

23 de marzo: transferencia de embriones

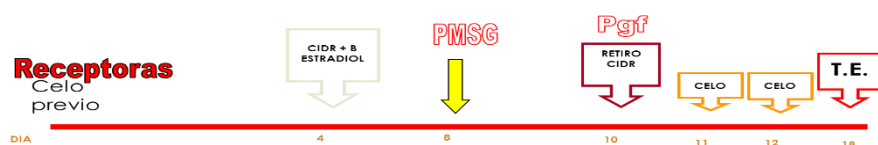


Figura 6: Protocolo de sincronización de vacas receptoras.

3.4.- Preparación de los materiales y medios

3.4.1.- Materiales y medio de colección y mantenimiento de los embriones

3.4.1.1.- Preparación de los materiales y medio de colección

El medio que se utilizó para la colección de los embriones para el presente trabajo fue DPBS Vigro Bioniche 2LT, que el mismo fue sumergido en baño maría a 36°C por 15 minutos para luego ser utilizado en la colección de los embriones mediante el lavado uterino.



Figura 7: Medio de lavado uterino, estilete, dilatador, sonda Foley y pinzas (a), sonda Foley con estilete (b), sonda Foley con camisa sanitaria (c) y preparación del filtro y mangueras (d).

3.4.1.2.- Medio de mantenimiento de los embriones

Para el mantenimiento del embrión se empleó el PBS enriquecida (VIGRO Holding Plus). Hasta, la realización de la vitrificación de los embriones de los embriones.

3.4.2.- Medios de vitrificación de los embriones

3.4.2.1.- Vitrificación con propilenglicol + glicerol (Pg+Gli)

Se empleó el protocolo descrito por (Massip y col, 1986). En este protocolo se utilizó glicerol y propilenglicol como crioprotectores para componer la solución de vitrificación.

- Solución de equilibrio en 10% glicerol + 20 % propilenglicol + 7 ml medio de mantenimiento.
- Solución de vitrificación en 25% glicerol + 25% propilenglicol + 5ml medio de mantenimiento.
- Solución de 0.3M de sacarosa (en 10 ml de medio de mantenimiento).

3.4.2.2.- Vitrificación con etilenglicol + glicerol (Eg+Gli)

Se empleó, con modificaciones, el protocolo de vitrificación descrito por (Yang y col, 1992), el cual fue desarrollado como una modificación del protocolo Pg+Gli. Este protocolo emplea etilenglicol y glicerol como crioprotectores para componer la solución de vitrificación.

- Solución de glicerol al 10% (1ml de glicerol + 9 ml de medio de mantenimiento).
- Solución de glicerol al 10% + etilenglicol al 20% (1 ml de glicerol + 2 ml de etilenglicol + 7 ml de medio de mantenimiento).
- Solución de glicerol al 25% + etilenglicol 25% (2.5 ml de glicerol + 2.5 ml de etilenglicol + 5 ml de medio de mantenimiento).
- Solución de 0.1M de sacarosa (en 10 ml de medio de mantenimiento).

3.5.- Recolección de los embriones

A los 7 días de que las vacas donadoras se inseminaron se realizó la recolección de los embriones por el método no quirúrgico, mediante el lavado uterino utilizando un circuito cerrado Teniendo en cuenta los siguientes pasos:

- Se realizó la Palpación de las donadoras para estimar el número de cuerpos lúteos.
- Luego se aplicó la anestesia epidural al 2% 6ml.
- Se realizó la limpieza de la vulva y zonas adyacentes.
- Secado de la vulva y zonas adyacentes.
- Luego es instalado el medio de lavado en una zona alta conectado a la manguera y filtro.
- Se introdujo un brazo por vía rectal.
- Se instaló la sonda Foley vía vaginal pasando la vagina, cérvix, cuerpo y Llegando al cuerno.
- Conectamos la manguera con la sonda Foley
- Liberamos el medio y lavamos el útero por gravedad
- Se abrió la vía de salida del medio y se procedió a masajear el cuerno uterino.
- Se repitió de 6 a 8 veces hasta completar 800ml a 1000 ml.
- Luego se retiró la sonda de Foley cuidadosamente.

El tiempo de colección de los embriones fue en un promedio de 25 a 30 minutos por vaca.

Luego de terminado el lavado del cuerpo uterino se prosiguió al retiro del filtro de colección en donde quedaron atrapados los embriones.



Figura 8: Lavado del cuerpo uterino para la recolección de embriones

3.6.- Búsqueda de embriones

El filtro de colección de los embriones fue llevado al laboratorio para proceder a la búsqueda y evaluación de los embriones.

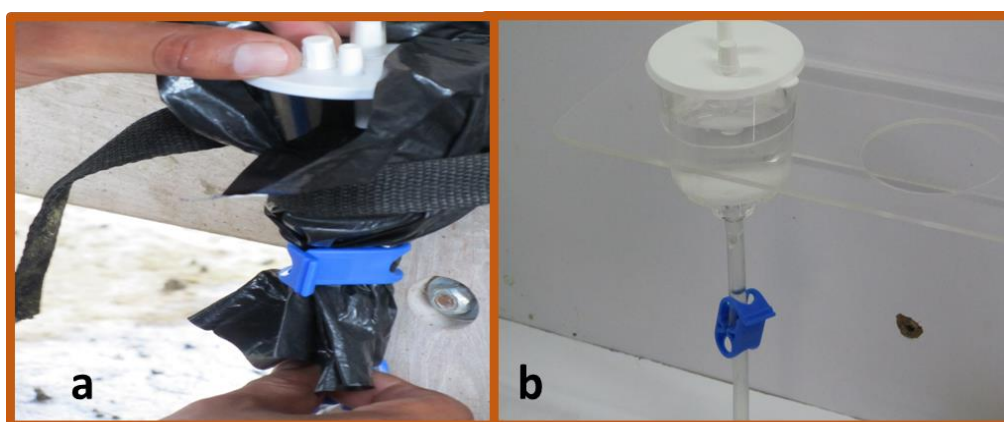


Figura 9: Filtro protegido de la luz solar en el lavado uterino (a), filtro con los embriones en el laboratorio (b).

El medio del filtro fue vaciado en una placa Petri cuadrículada para realizar la búsqueda con la ayuda de un estereoscopio a 10X y 40X, la búsqueda se realizó cuadro por cuadro para poder encontrar los embriones.



Figura 10: Vaciado y enjuague del filtro a la placa Petri cuadrículada (a), búsqueda de los embriones en la placa Petri cuadrículada (b).

Luego los embriones fueron aspirados con la ayuda de una micro pipeta y llevados a una placa Petri redonda que contiene un medio de mantenimiento (VIGRO Holding plus).

Los embriones son lavados 10 veces en gotas de medio de mantenimiento, luego se colocaron en una placa Petri redonda para luego ser evaluados e identificados según su calidad y morfología.

En el presente trabajo se recolecto un total de 33 embriones y 6 óvulos de las 3 vacas donadoras de embriones.

3.6.- Evaluación de los embriones

Los embriones recuperados se clasifico de acuerdo a su estado de desarrollo y apariencia morfológica.

La placa Petri junto con los embriones lavados, fueron expuestos al microscopio estereoscopio a 10X y 40X, en el cual se observó todos los estadios de desarrollo, estructuras y características morfológicas de los embriones para su clasificación.

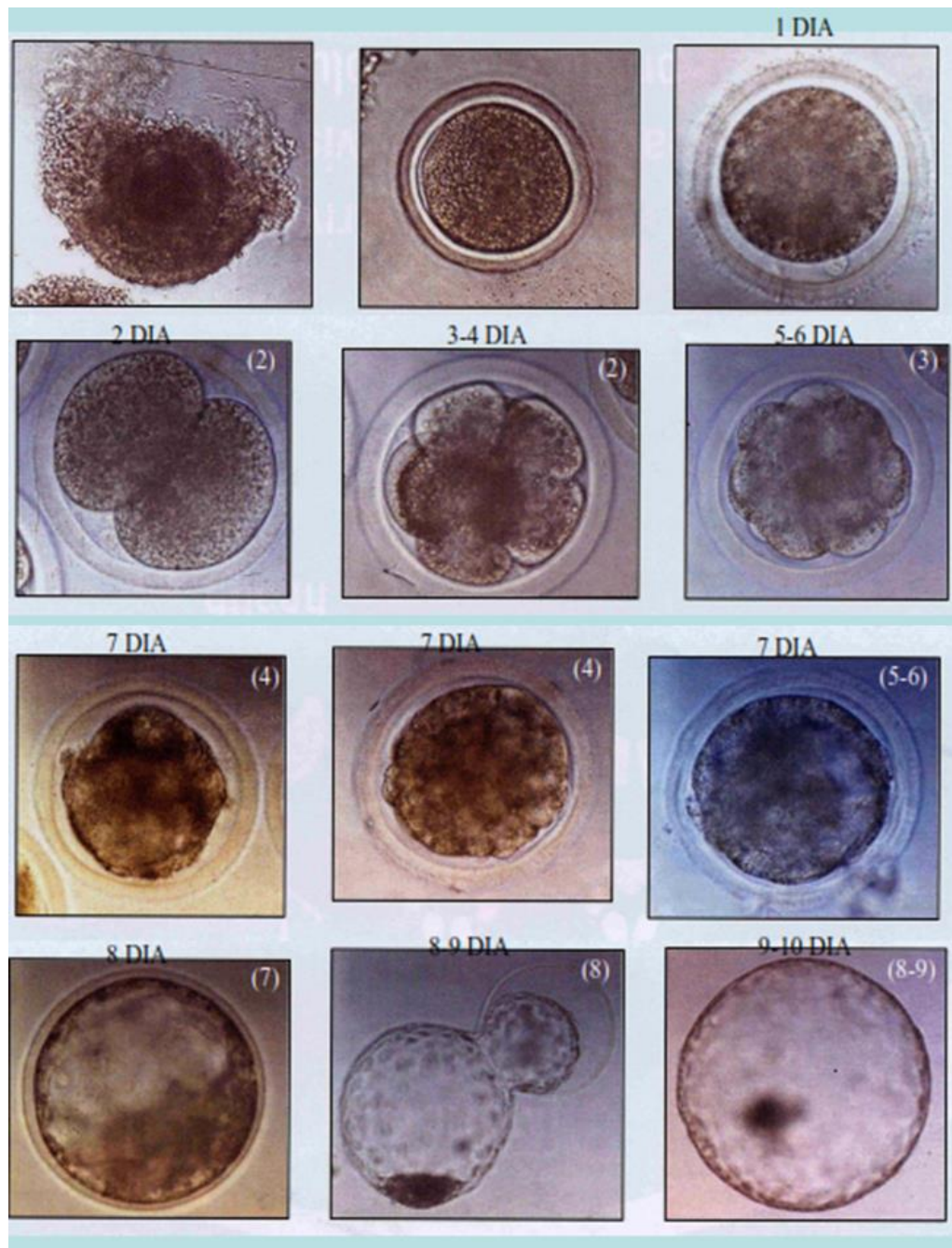


Figura 11: Clasificación de los embriones según su estado de desarrollo

Los embriones de calidad 1 (excelentes), calidad 2 (buenos), en sus diferentes estadios de desarrollo embrionario fueron seleccionados y preparados para que luego sean sometidos a los protocolos de vitrificación.

Para la vitrificación de los embriones se utilizaron embriones que coincidían con los de calidad 1 y 2 tal como recomiendan (Palma, 2008) y (De Armas, 2007).

3.7.- Procedimiento de crío preservación

3.7.1.- Vitrificación con propilenglicol + glicerol (protocolo 1)

Cuadro 2. Embriones vitrificados con Protocolo 1 (propilenglicol + glicerol)

| Embriones según Estado de Desarrollo | Clasificación de los embriones según su calidad (n) | | | | TOTAL |
|--------------------------------------|---|-----------|-----------|-----------|-------|
| | calidad 1 | calidad 2 | calidad 3 | calidad 4 | |
| E4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| E5 | 3 | 2 | 0 | 0 | 5 |
| E6 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| E7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| TOTAL | 9 | 4 | 0 | 0 | 13 |

En el presente cuadro se muestra los embriones que son vitrificados con el protocolo 1, y que fueron clasificados únicamente los de calidad 1 y 2 en sus diferentes estadios de desarrollo

Estos son los embriones que fueron lavados, seleccionados y posteriormente fueron sometidos al siguiente protocolo.

- En la primera placa petry se expuso los embriones a la solución de 10% glicerol + 20% propilenglicol durante 10 minutos.
- En una segunda placa petry se expuso los embriones en un medio de vitrificación de 25% glicerol + 25% propienglicol durante 45 segundos.
- Luego los embriones fueron aspirados en pajuelas de 0.25 ml quedando en la parte central de la pajilla: solución de sacarosa al 0.3M, burbuja de aire, embrión en medio de vitrificación, burbuja de aire y solución de sacarosa 0.3M.
- Por ultimo las pajillas fueron selladas con tampones hechas de plástico e inmediatamente terminado el sellado, las pajillas fueron introducidos dentro del nitrógeno líquido (-196°C) y almacenados.

3.7.2.- Vitrificación con etilenglicol + glicerol (protocolo 2)

Cuadro 3. Embriones vitrificados con Protocolo 2 (etilenglicol + glicerol)

| Embriones según Estado de Desarrollo | Clasificación de los embriones según su calidad (n) | | | | TOTAL |
|---|---|-----------|-----------|-----------|-------|
| | calidad 1 | calidad 2 | calidad 3 | calidad 4 | |
| E4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| E5 | 3 | 2 | 0 | 0 | 5 |
| E6 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| E7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| TOTAL | 9 | 4 | 0 | 0 | 13 |

En el cuadro se muestra los embriones que son vitrificados con el protocolo 2, y que fueron clasificados únicamente los de calidad 1 y 2 en sus diferentes estadios de desarrollo.

Los embriones fueron lavados y seleccionados y posteriormente sometidos al siguiente protocolo.

- En la primera placa petry se expuso los embriones a la solución del 10% de glicerol por 5 minutos.
- En la segunda placa petry se expuso los embriones a la solución de 10% glicerol + 20% etilenglicol durante 5 minutos.
- En una tercera placa petry se expuso los embriones al medio de vitrificación de 25% glicerol + 25% etilenglicol durante 30 segundos.
- Luego los embriones fueron aspirados en pajuelas de 0.25 ml quedando en la parte central de la pajilla: solución de sacarosa al 0.1M, burbuja de aire, embrión en medio de vitrificación, burbuja de aire y solución de sacarosa 0.1M.

Por ultimo las pajillas fueron selladas con tampones hechas de plástico e inmediatamente terminado el sellado, las pajillas fueron introducidos dentro del nitrógeno líquido (-196°C) y almacenados hasta su evaluación post descongelación.

3.8.- Descongelación de embriones

Para la descongelación de los embriones vitrificados se procedió de la siguiente manera:

- Se extrajeron las pajillas del tanque de nitrógeno y se suspendió por 5 segundos en el aire.
- Luego la pajilla se introdujo en baño maría a 30°C por 10 segundos.
- La remoción de los crioprotectores se realizó manteniendo por 5 minutos junto al contenido de la pajilla vaciada y seguidamente por otros 2 minutos en el medio de mantenimiento.
- Por último, los embriones fueron lavados tres veces para que posteriormente sean clasificados y evaluados de acuerdo a su morfología.

3.9.- Evaluación de los embriones post descongelación

Luego de que los embriones fueron descongelados mediante un protocolo de descongelación, los embriones son expuestos al microscopio estereoscópico a 10X y 40X en placas Petri con el medio de mantenimiento, en el cual se observaron todas las estructuras y características morfológicas de los embriones, forma del embrión, color y textura de la masa celular, diferencia de tamaño entre las blastómeros, número y nivel de compactación de los blastómeros, presencia de blastómeros sueltas o separadas. Los embriones seleccionados en sus cuatro estadios de desarrollo y calidad 1 (excelentes) y calidad 2 (buenos), son los embriones que fueron considerados como embriones viables aptos para la transferencia, y las que son transferidas a vacas criollas receptoras de embriones.

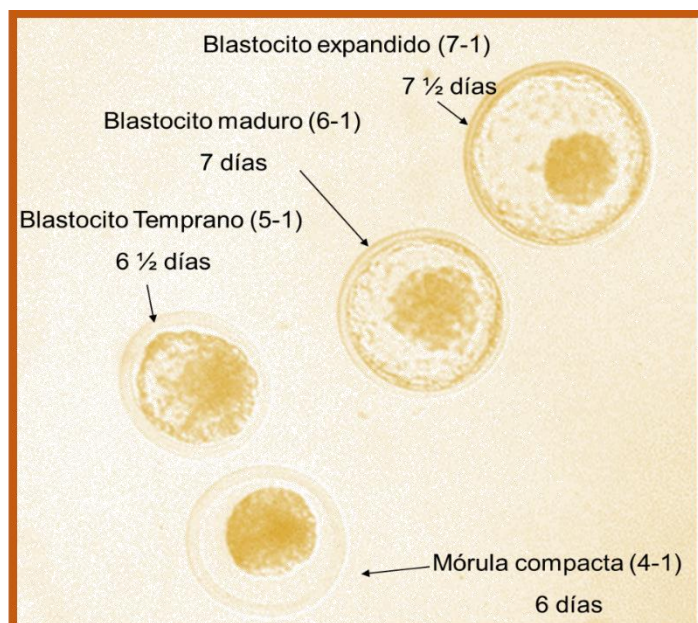


Figura 12: Clasificación de los embriones según su estado de desarrollo y calidad.

3.10.- Transferencia de embriones

Luego de que los embriones son descongelados, los embriones son evaluados y clasificados de acuerdo a su estado de desarrollo y calidad. Los embriones de calidad (1 y 2) son seleccionados como embriones viables, embriones que presentan una buena compactación de blastómeros y una buena textura de la masa celular, estructura uniforme, simétricos, de forma esferoide y la zona pelucida está intacta. Y son aptos para la transferencia a vacas receptoras.

Los embriones de calidad (3 y 4) son considerados como embriones no viables, que presentan una forma irregular del embrión, blastómeros sueltas no muy bien definidas, zona pelucida ligeramente agrietado, forma muy asimétrica. Estos embriones no son aptos para la transferencia a vacas receptoras.

Los embriones de calidad (1 y 2) que fueron seleccionados como viables son cargados en pajuelas de 0.25 ml aptos para transferencia.

Cuadro 4. Embriones transferidos según su estado de desarrollo y calidad con cada protocolo.

| Nº vacas Receptoras | Embrión transferido con propilenglicol + glicerol | Embrión transferido con etilenglicol + glicerol |
|---------------------|---|---|
| 1 | (4-1) | (4-1) |
| 2 | (4-1) | (4-1) |
| 3 | (5-1) | (4-1) |
| 4 | (4-2) | (5-1) |
| 5 | (5-2) | (5-1) |
| 6 | (5-2) | (4-2) |

(4-1) = Mórula de calidad 1

(4-2) = Mórula de calidad 2

(5-1)= Blastocisto temprano de calidad 1 (5-2)=Blastocisto temprano de calidad 2

La técnica como se realizó la transferencia de embriones es como sigue:

- Se evaluaron las vacas receptoras mediante la palpación rectal para la determinación de la calidad del cuerpo lúteo presente en el ovario para su transferencia de un embrión, vacas con una buena presencia de cuerpo lúteo fueron seleccionados para su transferencia, y vacas con una baja presencia de cuerpo lúteo fueron descartados para su transferencia del embrión.
- Luego se procedió a lavar la vulva con agua y yodo al 1% para su desinfección, y su posterior aplicación con alcohol, sujeción de la cola de la vaca.
- Cargado de pajuelas en la funda y pistola de transferencia de embriones, cubriendo la pistola con el chemis o camisa sanitaria antes de la transferencia.
- Introducción de la pistola de transferencia de embriones con la Pajilla del embrión a través del cérvix.
- Deposición del embrión en el cuerno uterino del ovario con cuerpo lúteo.
- Se retiró la pistola de transferencia de embriones con bastante cuidado

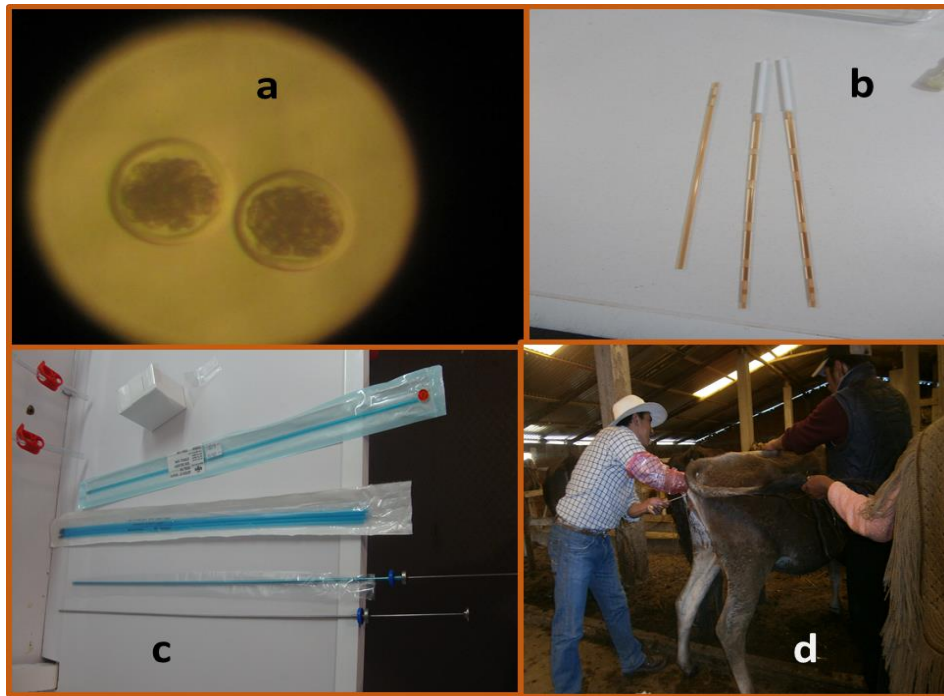


Figura 13: Embriones a transferir (a), embrión cargado a la pajuela (b), embrión cargado a la pistola de transferencia (c) y transferencia a la vaca receptora (d).

3.11.- Diagnóstico de preñez

3.11.1.- Mediante la palpación rectal

El diagnóstico mediante palpación rectal se realizó a los 60 días de transcurrido la transferencia del embrión, mediante la introducción de un brazo vía rectal para la localización de algunos signos que nos indique la confirmación de una preñez.

En algunas vacas receptoras se pudieron apreciar la existencia de la vesícula amniótica, la presencia de las membranas embrionarias y fetales comprobadas en forma de doble pared y como también se pudo apreciar la presencia del feto o de diferentes partes del mismo, entre otros.

Cuadro 5. Vacas receptoras preñadas y no preñadas con el propilenglicol + glicerol y etilenglicol + glicerol

| Nº Recep. | Embrión Transferido con propilenglicol + glicerol | Embrión Transferido con etilenglicol + glicerol |
|-----------|---|---|
| 1 | SI | SI |
| 2 | SI | SI |
| 3 | NO | SI |
| 4 | NO | SI |
| 5 | NO | NO |
| 6 | NO | NO |

3.10.- Análisis estadístico

3.10.1.- Diseño estadístico para determinar la calidad del embrión

Para la investigación se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 2PX4E con 8 tratamientos y 3 repeticiones o sea 24 unidades experimentales con datos transformados a $\sqrt{(x + 0.5)}$.

Modelo estadístico lineal

$$Y_{ij} = u + P_i + E_j + (PE)_{ij} + A_{ijk}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, t$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, n$$

$$k = 1, 2, 3, \dots, r$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variable respuesta en la j-ésima embion del i-ésimoprotocolo

u = Es el efecto de la media general o constante común.

P_i = Efecto verdadero de i-esimo nivel de protocolo P1, P2

E_j = Efecto verdadero de j-esimo nivel de estadio E4, E5, E6, E7

$(PE)_{ij}$ = Efecto verdadero de la interacción del i-esimo nivel de protocolos con el j-esimo nivel de estadio

A_{ijk} = Efecto verdadero de la k-esima unidad experimental del factor R, sujeto a la ij-esima combinación de tratamientos.

ANDEVA

| F. de V. | G.L. |
|-----------------|------------------|
| Protocolos(P) | $p - 1 = 1$ |
| Estadios (E) | $e - 1 = 3$ |
| PXE | $(p-1)(e-1) = 3$ |
| Error exp. | $pe(r-1) = 16$ |
| Total | $per - 1 = 23$ |

VARIABLES DE RESPUESTA Y OBSERVACIONES

VARIABLES DE RESPUESTA

a). calidad de embriones

- Calidad 1 (embriones excelentes)
- Calidad 2 (embriones buenos)
- Calidad 3 (embriones regulares)
- Calidad 4 (embriones malos)

Forma, Color, textura de la masa celular, forma y estado de la zona pelúcida

b). porcentaje de preñez %

c). costo de la vitrificación S/.

OBSERVACIONES

- Tipo de alimentación de las vacas en tratamiento
- Sistema de crianza y manejo de las vacas

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Embriones y óvulos obtenidos de vacas Brown Swiss

Cuadro 6. Número de embriones y óvulos obtenidos de las tres donadoras

| Vaca donante | Recolección | |
|--------------|---------------|------------|
| | Embriones (n) | Óvulos (n) |
| Gloria | 14 | 1 |
| Lulú | 8 | 3 |
| Dorina | 11 | 2 |

Tal como se muestra en el cuadro 6, hay una diferencia en número de embriones producidos por vaca donante, es así que la vaca donante Gloria fue la que produjo más cantidad de embriones con un total de 14 embriones, con respecto a los otros dos. Sin embargo, la respuesta a estos tratamientos de superovulación es muy variable y difícil de predecir el número de embriones que producirá una vaca donadora (Hasler et al., 1983).

Estos resultados también van asociados a la variabilidad en la respuesta ovárica con causas relacionadas con los tratamientos utilizados para inducir la superovulación, las preparaciones hormonales, los lotes de gonadotropinas, la duración del tratamiento, el momento del tratamiento con relación al ciclo estral, la dosis total de gonadotropinas y el uso de hormonas adicionales. También hay otros factores importantes que son inherentes al animal y a su ambiente, la historia reproductiva Reproducción Bovina, la edad, la estación del año, la raza y el estado ovárico en el momento del tratamiento (Lindsell et al., 1986).

4.2.- Calidad de los embriones por vaca donadora

Cuadro 7. Embriones clasificados según su calidad.

| DONADORAS | Embriones según su calidad | | | | Total de embriones |
|--------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| | Calidad 1 | Calidad 2 | Calidad 3 | Calidad 4 | |
| Gloria | 7 | 2 | 3 | 2 | 14 |
| Lulu | 5 | 3 | 0 | 0 | 8 |
| Dorina | 6 | 3 | 2 | 0 | 11 |
| total | 18 | 8 | 5 | 2 | 33 |

De acuerdo a este cuadro 7, se puede apreciar que las tres donadoras produjeron 18 embriones de calidad 1, 8 embriones de calidad 2, 5 embriones de calidad 3 y 2 embriones de calidad 4, este resultado puede estar relacionado al encontrado por (Garcia, 2008), quien indica que las vacas con mayor edad producen mayores y mejores embriones, y no siendo a si para las vacas primerizas que en algunos casos no producen embriones.

Se observó que, del total de vacas en estudio, produjeron 33 embriones de calidad 1, calidad 2, calidad 3 y calidad 4, (Asprom, 2004) encontró que, de todas las donadoras, un 33% de ellas no producen embriones viables, (Gorlach, 1997) indica que el éxito y fracaso se encuentran estrechamente ligados en trabajos de este tipo y, a menudo, no hay ninguna explicación posible ante resultados infructuosos habiéndose seguido estrictamente el plan de trabajo.

4.3.- Embriones post vitrificados con el protocolo 1 y protocolo 2

Cuadro 8. Clasificación de los embriones post vitrificación con el protocolo 1 y protocolo 2 según su calidad.

| Estado de desarrollo | Clasificación de los embriones según su calidad con el protocolo 1 (n) | | | | Clasificación de los embriones según su calidad con el protocolo 2 (n) | | | | Total |
|----------------------|--|-----------|-----------|-----------|--|-----------|-----------|-----------|-------|
| | Calidad 1 | Calidad 2 | Calidad 3 | Calidad 4 | Calidad 1 | Calidad 2 | Calidad 3 | Calidad 4 | |
| E4 | 2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 8 |
| E5 | 1 | 2 | 0 | 2 | 2 | 3 | 0 | 0 | 10 |
| E6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 6 |
| E7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Total | 3 | 4 | 2 | 4 | 5 | 5 | 3 | 0 | 26 |

En el cuadro 8, se puede ver la clasificación de los embriones después de la vitrificación con el protocolo 1 y protocolo 2, en donde se puede observar un total de 8 mórulas, 10 blastocistos tempranos, 6 blastocistos maduros y 2 blastocistos expandidos. Un total de 26 embriones en sus diferentes calidades.

4.3.1.- Calidad 1 (excelentes)

Cuadro 9. Embriones de calidad 1 con datos transformados a $\sqrt{(x+0.5)}$.

| Repeticiones | Protocolo 1 | | | | protocolo 2 | | | | |
|--------------|-------------|------|------|------|-------------|------|------|------|-------|
| | E4 | E5 | E6 | E7 | E4 | E5 | E6 | E7 | |
| 1 | 1.22 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | 1.22 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | |
| 2 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 1.22 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | |
| 3 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | |
| Total | 3.16 | 2.64 | 2.12 | 2.12 | 3.67 | 3.16 | 2.12 | 2.12 | 21.11 |
| X | 1.05 | 0.88 | 0.71 | 0.71 | 1.22 | 1.05 | 0.71 | 0.71 | 0.88 |

En el cuadro 9, se observa el número de embriones excelentes (calidad 1) en los diferentes estadios de desarrollo con datos transformados a $\sqrt{(x + 0.5)}$, y esos datos han sido utilizados para calcular el análisis de varianza, y los datos reales podemos observar en anexo 3.

Cuadro 10. Análisis de varianza para embriones excelentes (calidad 1).

| F. de V. | GL | SC | CM | FC | SIG. | F. tabular | |
|---------------|-----------|--------------|-------|-------|------|------------|------|
| | | | | | | 5% | 1% |
| Tratam. Comb. | 7 | 0.893 | 0.128 | 3.810 | * | 2.66 | 4.03 |
| Factor P | 1 | 0.045 | 0.045 | 1.333 | NS | 4.49 | 8.53 |
| Factor E | 3 | 0.804 | 0.268 | 8.000 | ** | 3.24 | 5.29 |
| Interac. PXE | 3 | 0.045 | 0.015 | 0.444 | NS | 3.24 | 5.29 |
| Error Exp. | 16 | 0.536 | 0.033 | | | | |
| Total | 23 | 1.429 | | | | | |

C.V. = 20.81%

Cuadro 11. Prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) para embriones calidad 1 (excelentes).

| Orden de mérito | Estadios | Numero de embriones | Promedio de embriones (datos transformados) | Sig. ≤ 0.05 |
|-----------------|----------|---------------------|---|------------------|
| 1 | E4 | 5 | 1.13 | a |
| 2 | E5 | 3 | 0.96 | a b |
| 3 | E7 | 0 | 0.71 | c |
| 4 | E6 | 0 | 0.71 | c |

En el cuadro 11, realizando la prueba de comparación múltiple de Duncan ($P \leq 0.05$), encontramos que el estadio E4 obtuvo mayor promedio de calidad 1 con 5 embriones y un promedio de 1.13 que es el mayor promedio obtenido de embriones vitrificados, seguido del estadio E5 con 3 embriones y un promedio de 0.96. Por lo tanto, si encontramos diferencia significativa entre E4 y E7, E4 y E6, E5 y E6, E5 y E7, pero no existe diferencias significativas entre los estadios E4 y E5, y entre E7 y E6 prueba realizada al 95% de probabilidad.

En el cuadro 10, se afirma que, si existe diferencia significativa entre tratamientos combinados, y también hay diferencia altamente significativa para el factor estadio (E), es decir existe diferencia estadística altamente significativas ($P \leq 0.05$) lo cual nos confirma que los estadios (E) actúan de forma diferente entre ellos. Esto genera por los cambios que suceden en

los diferentes estadios de desarrollo embrionario, pueden influir también en su tolerancia a la vitrificación. Un estudio realizado en ratones encontró que la permeabilidad al glicerol y etilenglicol aumento en el estadio de mórula, lo cual lo atribuyeron a los cambios que sufre el embrión durante este estadio (preparación para la compactación), incrementándose varias actividades fisiológicas (Pedro et al., 2005). En bovinos se evidencio que embriones recuperados al día 7 de hembras superovuladas, los estadios más tardíos (blastocistos) tienen mejor calidad que los menos desarrollados (mórulas) produciendo mayores tasas de preñez (Callensen et al., 1995). En otros estudios, los embriones de vacunos en estadios avanzados tuvieron mejor resistencia a la congelación y sobrevivencia in vitro después de la descongelación que los estadios más tempranos, observándose la mayor expansión embrionaria en el estadio de blastocisto de 7.5 días (Ferre et al., 2002).

El diámetro de los embriones en sus diferentes estadios de desarrollo también podría estar relacionado al éxito de la vitrificación, ya que embriones más grandes, de mayor volumen y liquido intracelular, tendrían mayor probabilidad de tener incompleta deshidratación durante la vitrificación, con el siguiente daño celular por formación de hielo intracelular. En vacas embriones en estadios más tempranos, con un menor diámetro, serían los más adecuados para ser vitrificados, ya que un estudio previo en el que blastocistos de alpacas de 7 días, con un diámetro promedio de 450 μm vitrificados y transferidos a receptoras no produjo ninguna preñez (Vasquez et al., 2007).

Finalmente, los resultados obtenidos hasta la fecha empleando el método de la vitrificación ha reportado resultados alentadores en vacunos. Además, es una técnica práctica, que no necesita equipos sofisticados como los congeladores programables para un descenso adecuado de la temperatura, los cuales son costosos u muchas veces no se adaptan a las condiciones de altura. Los embriones de vacas parecen ser especialmente sensibles al enfriamiento por poseer mayor cantidad de lípidos intracelulares (Pereira et al., 2008). Esta característica podría disminuir su

tolerancia a los daños causados por la vitrificación, lo que haría que los embriones necesiten de un procedimiento de vitrificación que disminuya el tiempo de exposición a temperaturas críticas.

4.3.2.- Calidad 2 (buenos)

Cuadro 12. Embriones de calidad 2 con datos transformados a $\sqrt{(x+0.5)}$.

| Repeticiones | Protocolo 1 | | | | Protocolo 2 | | | | |
|--------------|-------------|------|------|------|-------------|------|------|------|-------|
| | E4 | E5 | E6 | E7 | E4 | E5 | E6 | E7 | |
| 1 | 1.22 | 1.22 | 1.22 | 0.71 | 1.22 | 1.22 | 1.22 | 0.71 | |
| 2 | 0.71 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | |
| 3 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | |
| Total | 2.64 | 3.16 | 2.64 | 2.12 | 2.64 | 3.67 | 2.64 | 2.12 | 21.63 |
| X | 0.88 | 1.05 | 0.88 | 0.71 | 0.88 | 1.22 | 0.88 | 0.71 | 0.90 |

En el cuadro 12, se observa el número de embriones buenos (calidad 2) en los diferentes estadios de desarrollo con datos transformados a $\sqrt{(x + 0.5)}$, y esos datos han sido utilizados para calcular el análisis de varianza, y los datos reales podemos observar en anexo 3.

Cuadro 13. Análisis de varianza para embriones buenos (calidad 2).

| F. de V. | GL | SC | CM | FC | SIG. | F. tabular | |
|---------------|-----------|--------------|-------|-------|------|------------|------|
| | | | | | | 5% | 1% |
| Tratam. Comb. | 7 | 0.614 | 0.088 | 1.571 | NS | 2.66 | 4.03 |
| Factor P | 1 | 0.011 | 0.011 | 0.200 | NS | 4.49 | 8.53 |
| Factor E | 3 | 0.569 | 0.190 | 3.400 | * | 3.24 | 5.29 |
| Interac. PXE | 3 | 0.033 | 0.011 | 0.200 | NS | 3.24 | 5.29 |
| Error Exp. | 16 | 0.893 | 0.056 | | | | |
| Total | 23 | 1.507 | | | | | |

C.V. = 26.22%

En el cuadro 13, se afirma que, si existe diferencia significativa en el factor estadio (E) es decir existe diferencia estadística significativas ($P \leq 0.05$) lo cual nos confirma que los estadios (E) actúan de forma diferente entre ellos.

Para una mejor interpretación de estos resultados se realizó la prueba múltiple de significancia de Duncan, para la correcta interpretación y obtención de conclusiones del presente estudio.

Cuadro 14. Prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) para embriones calidad 2 (buenos).

| Orden de mérito | Estadios | Numero de embriones | Promedio de embriones (datos transformados) | Sig. ≤ 0.05 |
|-----------------|----------|---------------------|---|------------------|
| 1 | E5 | 5 | 1.13 | a |
| 2 | E6 | 2 | 0.88 | b |
| 3 | E4 | 2 | 0.88 | b |
| 4 | E7 | 0 | 0.71 | b |

En el cuadro 14, realizada la prueba de comparación múltiple de Duncan ($P \leq 0.05$) encontramos que el estadio E5 con 5 embriones y un promedio de 1.13 tiene un mayor promedio de embriones y seguido del estadio E6 con 2 embriones y un promedio de 0.88 seguido del estadio E4 también con dos embriones y un promedio de 0.88, al final está el estadio E7 con cero embriones y un promedio de 0.71. Presentando diferencia significativa entre E5 y E7, prueba realizada al 95% de probabilidad.

En el cuadro 13, podemos observar que en la vitrificación los estadios actúan de forma diferente, esta diferencia se debería a que el número de pasos o soluciones al que los embriones son expuestos previos a la vitrificación, podría influir en la cantidad de crioprotector que ingrese a estos, y debe ser un aspecto importante que debe ser considerado. La elección sobre cuantos pasos debe realizarse durante la vitrificación podría estar relacionado al estadio embrionario, ya que se ha visto que los blastocistos tempranos y expandidos que aún conservan la zona pelúcida, tienen mayor dificultad en el intercambio de los crioprotectores, necesitan mayor tiempo de exposición, por tanto, se requeriría más pasos para conseguir la equilibración y dilución de los crioprotectores en el embrión. Algunos autores consideran que, con un solo paso, es decir sin una equilibración del embrión podría ser conveniente para embriones sin zona pelúcida (Cervera et al., 2003). Los embriones en el presente estudio al ser blastocistos, no tendrían dificultad en la difusión de los crioprotectores permeables, por lo tanto, se consideró que 2 pasos (una solución de equilibración y una de vitrificación) serían suficientes. Tres pasos podrían aumentar el riesgo de toxicidad por mayor posibilidad de ingreso de los

crioprotectores, y un solo paso, sin equilibración previa, podría causar shock osmótico, por un medio extracelular hiperosmótico.

Esta diferencia en el comportamiento en la vitrificación de los embriones de calidad 2 en diferentes estadios es también por el uso del crioprotector permeable etilenglicol por su baja toxicidad celular y su rápida capacidad de difusión a través de la membrana plasmática (Emiliani et al., 2000).

Además, la sacarosa (crioprotector no permeable) confiere un efecto protector adicional a los protocolos 1 y 2 en diferentes cantidades en ambos, es por ello que se encontró diferencias en las tasas de desarrollo entre los protocolos, en los que se varió la concentración de sacarosa adicionada a la solución de vitrificación. Sin embargo, el uso de la solución etilenglicol + glicerol combinado con sacarosa 0.1 M mostro mayor número de embriones de calidad 1. La sacarosa confiere un efecto crioprotector adicional debido a que este crioprotector no permeable provoca la deshidratación del embrión, con lo cual reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular y provoca una concentración de las macromoléculas del citoplasma, facilitando la vitrificación intracelular. Estos resultados confirman los hallazgos previos sobre una mejora en la sobrevivencia in vitro de las mórulas y blastocistos luego de la vitrificación con adición de azúcares tales como la sacarosa, dextrosa y trealosa. Sin embargo, solo el uso de bajas concentraciones de sacarosa (0.1 y 0.3 M) tiene un efecto positivo, por cuanto una concentración más alta (0.5 M) resulto con menores tasas de sobrevivencia (Rall, 1992).

4.3.3.- Calidad 3 (regulares)

Cuadro 15. Embriones de calidad 3 con datos transformados a $\sqrt{(x+0.5)}$.

| Repeticiones | Protocolo 1 | | | | Protocolo 2 | | | | |
|--------------|-------------|------|------|------|-------------|------|------|------|-------|
| | E4 | E5 | E6 | E7 | E4 | E5 | E6 | E7 | |
| 1 | 1.22 | 0.71 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 1.22 | 1.22 | |
| 2 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 1.22 | 0.71 | |
| 3 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | |
| Total | 2.64 | 2.12 | 2.64 | 2.12 | 2.12 | 2.12 | 3.16 | 2.64 | 19.56 |
| X | 0.88 | 0.71 | 0.88 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 1.05 | 0.88 | 0.81 |

En el cuadro 15, se observa el número de embriones regulares (calidad 3) en los diferentes estadios de desarrollo con datos transformados a

$\sqrt{(x + 0.5)}$, y esos datos han sido utilizados para calcular el análisis de varianza, y los datos reales podemos observar en anexo 3.

Cuadro 16. Análisis de varianza para embriones regulares (calidad 3).

| F. de V. | GL | SC | CM | FC | SIG. | F. tabular | |
|---------------|-----------|--------------|-------|-------|------|------------|------|
| | | | | | | 5% | 1% |
| Tratam. Comb. | 7 | 0.346 | 0.049 | 1.107 | NS | 2.66 | 4.03 |
| Factor P | 1 | 0.011 | 0.011 | 0.250 | NS | 4.49 | 8.53 |
| Factor E | 3 | 0.212 | 0.071 | 1.583 | NS | 3.24 | 5.29 |
| Interac. PXE | 3 | 0.123 | 0.041 | 0.917 | NS | 3.24 | 5.29 |
| Error Exp. | 16 | 0.715 | 0.045 | | | | |
| Total | 23 | 1.061 | | | | | |

C.V. = 25.23%

En el cuadro 16, se observa que no existe diferencia significativa entre tratamientos combinados, factor protocolo (P), factor estadio (E) y la interacción PxE, es decir no existe diferencia estadística significativas ($P \leq 0.05$) lo cual nos confirma que los estadios (E) actúan de forma similar entre ellos, y de igual manera los protocolos (P).

Los embriones de calidad 3, actúan de forma similar en ambos protocolos y como también en sus diferentes estadios esto puede producirse por que el efecto osmótico que se presentaría generalmente en embriones de calidad 3 donde la disminución del volumen celular por una pérdida importante de agua determinaría modificaciones en la composición del medio intracitoplasmático (Karow, 2001).

En este caso, los solutos altamente concentrados podrían precipitar o afectar la conformación proteica y consecuentemente su función metabólica. También la deshidratación favorecería la deshidratación de las estructuras citoplasmáticas, aproximándose tanto que permitiría reacciones intermoleculares como uniones entre grupos sulfidrilos libres de tipo irreversible (Karow, 2001).

Con respecto al aumento excesivo de volumen, pareciera ser crítico el manejo de los embriones inmediatamente después de la descongelación. La alta concentración de crioprotectores intracelulares puede determinar que las células que las células embrionarias incorporen agua y aumenten

excesivamente de volumen, pudiendo dañar estructuras internas o bien desintegrarse por completo los embriones (Mucci et al., 2006).

4.3.4.- Calidad 4 (malos)

Cuadro 17. Embriones de calidad 4 con datos transformados a $\sqrt{(x+0.5)}$.

| Repeticiones | Protocolo 1 | | | | Protocolo 2 | | | | |
|--------------|-------------|------|------|------|-------------|------|------|------|-------|
| | E4 | E5 | E6 | E7 | E4 | E5 | E6 | E7 | |
| 1 | 0.71 | 1.22 | 1.22 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | |
| 2 | 0.71 | 1.22 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | |
| 3 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | |
| Total | 2.12 | 3.16 | 2.64 | 2.64 | 2.12 | 2.12 | 2.12 | 2.12 | 19.04 |
| X | 0.71 | 1.05 | 0.88 | 0.88 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.71 | 0.79 |

Cuadro 18. Análisis de varianza para embriones malos (calidad 4).

| F. de V. | GL | SC | CM | FC | SIG. | F. tabular | |
|---------------|-----------|--------------|-------|-------|------|------------|------|
| | | | | | | 5% | 1% |
| Tratam. Comb. | 7 | 0.357 | 0.051 | 1.524 | NS | 2.66 | 4.03 |
| Factor P | 1 | 0.179 | 0.179 | 5.333 | * | 4.49 | 8.53 |
| Factor E | 3 | 0.089 | 0.030 | 0.889 | NS | 3.24 | 5.29 |
| Interac. PXE | 3 | 0.089 | 0.030 | 0.889 | NS | 3.24 | 5.29 |
| Error Exp. | 16 | 0.536 | 0.033 | | | | |
| Total | 23 | 0.893 | | | | | |

C.V. = 23.07%

Cuadro 19. Prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) para embriones calidad 4 (malos)

| Orden de mérito | Protocolo | Numero de embriones | Promedio de embriones con datos transformados | Sig. ≤ 0.05 |
|-----------------|-----------|---------------------|---|------------------|
| 1 | P1 | 13 | 0.88 | a |
| 2 | P2 | 13 | 0.71 | b |

En el cuadro 19, realizada la prueba de comparación múltiple de Duncan ($P \leq 0.05$), indica que con el protocolo 1 se obtuvo mayor promedio de embriones de calidad 4, con un promedio de 0.88, seguido del protocolo 2 con un promedio de embriones de 0.71. Por lo tanto, si encontramos diferencia significativa entre P1 y P2, prueba realizada al 95% de probabilidad.

En el cuadro 18, se observa que no existe diferencia significativa entre tratamientos combinados, factor estadios (E) y la interacción PxE, pero si existe diferencia significativa en el factor protocolo (P) es decir existe diferencia estadística significativas ($P \leq 0.05$) lo cual nos confirma que los protocolos (P) actúan de forma diferente entre ellos. Esta diferencia se

debería a que no se cumplió eficazmente los protocolos utilizados durante el proceso de vitrificación, esto en el protocolo 1, ya que había que pasar de un medio de menor concentración de crioprotectores a otro con mayor concentración de crioprotectores en especial en el último medio de vitrificación, ya que en este las concentraciones eran muy altas y tenían que permanecer solo por 30 segundos, sin embargo esto no se cumplió en el protocolo 1, ya que al momento de cargar los embriones a la pajilla, estas permanecían mayor tiempo en el medio de vitrificación, provocando un efecto osmótico negativo, primero por pérdida de agua y luego por incremento de agua dañando algunas estructuras internas del embrión. Para obtener buenos resultados al vitrificar embriones se deben tomar en cuenta el tiempo de equilibrio que es de 30 segundos (Arav et al., 2000); ya que éste está estrechamente relacionado con la permeabilidad y la toxicidad del crioprotector (Ushijima y Kuwayama, 2004).

Otro factor es también por que los embriones fueron sumergidos directamente al nitrógeno líquido con el protocolo 1 de vitrificación, causando mayor incidencia de fracturas a nivel de la zona pelúcida de los embriones. Mientras que (Bejar y Gatius, 2002), recomiendan que las pajillas sean enfriadas previamente en los vapores de nitrógeno líquido durante 2 minutos disminuyendo la cantidad de fracturas en la zona pelúcida de los embriones.

En otras investigaciones asociaron distintos crioprotectores (DMSO, EG, alcohol polivinílico, dextrano) y a concentraciones bajas, causa menor toxicidad bioquímica y menor estrés osmótico a los embriones durante el proceso de vitrificación (Cabrera et al., 2006). También a que el dextrano baja las tensiones mecánicas que ocurren durante la congelación y la formación de una matriz viscosa en torno a los embriones, lo que evita la cristalización de la fase de transición entre sólido y líquido durante el calentamiento, por lo cual obtuvieron mejores resultados aquellos protocolos que utilizaron el dextrano (Viudes de Castro, 2010).

4.4.- Porcentaje de preñez en vacas receptoras de embriones vitrificados con Protocolo 1 y Protocolo 2

Cuadro 20. Resultados obtenidos de vacas criollas preñadas y no preñadas.

| Repeticiones vacas | Protocolos | |
|--------------------|------------|-------|
| | P1 | P2 |
| I | SI | SI |
| II | SI | SI |
| III | NO | SI |
| IV | NO | SI |
| V | NO | NO |
| VI | NO | NO |
| Preñadas | 2 | 4 |
| No preñadas | 4 | 2 |
| % preñez | 33.33 | 66.67 |

En el cuadro 20, se observa los resultados obtenidos en la transferencia de los embriones post vitrificación con Protocolo 1 y Protocolo 2, teniendo un 34% de preñez con el protocolo 1 y 67% con el protocolo 2, lo que nos da a conocer que con el protocolo 2 se tuvo mayor influencia de preñez.

Las receptoras tratadas en el protocolo 2 tuvieron buenos cuerpos lúteos en cuanto a su tamaño. Debido a las relaciones entre embrión y ovario, los porcentajes de fertilidad aumentan al depositar los embriones en el cuerno del ovario activo, ipsilateral, llegando a incrementar hasta en 50% el número de receptoras gestantes (Seidel, 1980).

Este resultado del 67% de preñez con el protocolo 2 frente al 34% obtenido con el protocolo 1, se da también porque con el protocolo 2 se transfirieron con 4 mórulas y 2 blastocistos tempranos de calidad 1 y esto tuvo mayor resultado. Con el uso de mórulas se tiene mayores resultados obteniéndose porcentajes de preñez de alrededor del 70% (Massip et al. 1986).

Un último factor a tener en cuenta en la transferencia a las receptoras es el factor humano, de tal manera que las tasas de fertilidad varían de un 20% al 67% según la habilidad de cada técnico, Así pues, la experiencia del operador es fundamental no solo en la palpación, sino en la transferencia para evitar cualquier daño a la receptora y así conseguir el mayor número de gestaciones (Hasler et al., 1987).

4.5.- Costo de la vitrificación de embriones

En el presente estudio se tuvo los costos de cada uno de los protocolos utilizados en la vitrificación de los embriones, como son los costos variables, costos fijos y costos totales de la vitrificación con cada uno de los protocolos, obteniéndose así el costo de la vitrificación de un embrión en cada uno de los protocolos utilizados en el presente trabajo de investigación.

Cuadro 21. Costo de la vitrificación de los embriones por protocolo

| MATERIALES Y MEDIOS DE VITRIFICACION | COSTO POR PROTOCOLO | | | | | | | | | |
|--|--------------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|---------------|------------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|---------------|
| | P1 (Propilenglicol + glicerol) | | | | | P2 (Etilenglicol + glicerol) | | | | |
| | UM | canti dad | costo unitari o | sub total en S/. | % | UM | canti dad | costo unitari o | sub total en S/. | % |
| COSTOS VARIABLES | | | | 277.38 | 64.90 | | | | 287.38 | 65.70 |
| Materiales de vitrificacion | | | | 132.20 | 30.93 | | | | 132.20 | 30.22 |
| Pajillas ¼ cc. | Paquete | 1.5 | 9.00 | 13.50 | 3.16 | Paquete | 1.5 | 9.00 | 13.50 | 3.09 |
| Conector de pajillas para identif ¼ cc. | Paquete | 0.25 | 30.00 | 7.50 | 1.75 | Paquete | 0.25 | 30.00 | 7.50 | 1.71 |
| Pajilla ½ cc. no esteril para identificacion | Ciento | 0.12 | 60.00 | 7.20 | 1.68 | Ciento | 0.12 | 60.00 | 7.20 | 1.65 |
| Cajas petri NunC 4 compartimientos 4/Pkg | Paquete | 0.5 | 20.00 | 10.00 | 2.34 | Paquete | 0.5 | 20.00 | 10.00 | 2.29 |
| Cajas Petri redondas 10 x 35 mm, 20/pkg | Paquete | 0.25 | 37.50 | 9.38 | 2.19 | Paquete | 0.25 | 37.50 | 9.38 | 2.14 |
| Punta de pipeta | Caja | 0.25 | 54.00 | 13.50 | 3.16 | Caja | 0.25 | 54.00 | 13.50 | 3.09 |
| Jeringas air tite 10 c.c. caja de 100 | Ciento | 0.12 | 126.00 | 15.12 | 3.54 | Ciento | 0.12 | 126.00 | 15.12 | 3.46 |
| caja de tecno port | Unidad | 0.5 | 10.00 | 5.00 | 1.17 | Unidad | 0.5 | 10.00 | 5.00 | 1.14 |
| Filtros milipore acrodiscos 1 pieza | Unidad | 2 | 25.50 | 51.00 | 11.93 | Unidad | 2 | 25.50 | 51.00 | 11.66 |
| Medios vitrificacion de embriones | | | | 145.18 | 33.97 | | | | 155.18 | 35.48 |
| Nitrogeno liquido | kilo | 2 | 12.00 | 24.00 | 5.62 | kilo | 2 | 12.00 | 24.00 | 5.49 |
| Vigro Bioniche Medio de Mantenimiento | sachet | 0.5 | 52.00 | 26.00 | 6.08 | sachet | 0.5 | 52.00 | 26.00 | 5.94 |
| Glicerol medio congelacion | sachet | 0.5 | 60.00 | 30.00 | 7.02 | sachet | 0.5 | 60.00 | 30.00 | 6.86 |
| propilenglicol | Frasco | 0.5 | 55.00 | 27.50 | 6.43 | | | | | 0.00 |
| etilenglycol | | | | | 0.00 | sachet | 0.5 | 75.00 | 37.50 | 8.57 |
| Vigro Bioniche sacaroza | Frasco | 0.5 | 75.36 | 37.68 | 8.82 | Frasco | 0.5 | 75.36 | 37.68 | 8.61 |
| COSTOS FIJOS | | | | 150.00 | 35.10 | | | | 150.00 | 34.30 |
| Personal especializado | Global | 1 | | 0.00 | 0.00 | Global | 1 | | 0.00 | 0.00 |
| alquiler de equipos y laboratorio | Global | 1 | 150.00 | 150.00 | 35.10 | Global | 1 | 150.00 | 150.00 | 34.30 |
| costo total de la vitrificacion | | | | 427.38 | 100.00 | | | | 437.38 | 100.00 |
| costo de vitrificacion por embrión | | | | 32.88 | 7.69 | | | | 33.64 | 7.69 |

En el cuadro 21, se muestra que el costo de la vitrificación de embriones es relativamente alto considerando el nivel tecnológico que se debe tener en cuenta en la vitrificación de los diferentes estadios del embrión, así como, el profesionalismo y capacitación del operador. En este sentido, el costo de los materiales de vitrificación en ambos protocolos (P1 y P2) es de s/ 132.20.

Los medios de la vitrificación de los embriones para el protocolo propilenglicol + glicerol (P1) tiene un costo de s/ 145.18, y para el protocolo etilenglicol + glicerol (P2) con un costo de s/ 155.18, es decir, s/ 10.00 más que el P1, esto debido a que

el sachet de etilenglicol es s/ 10.00 más que el propilenglicol. Siendo todo esto componente de los costos variables, tenemos que para el protocolo P1 (propilenglicol + glicerol) es de s/ 277.38 y para el protocolo P2 (etilenglicol + glicerol) es de s/ 287.38, en el primer protocolo representa un 64.90 %, y en el segundo protocolo representa un 65.70 % de los costos variables.

En relación a los costos fijos en ambos protocolos (P1 y P2) tenemos un costo de s/ 150.00 los insumos que representan en el protocolo 1 un 35.10 % y en el protocolo 2 un 34.30 % del costo total.

Referente al costo total de la vitrificación tenemos que para el protocolo propilenglicol + glicerol (P1) es de s/ 427.38 y para el protocolo etilenglicol + glicerol (P2) con un costo total de 437.38.

Finalmente, el costo de vitrificación por embrión en el protocolo P1 es de s/ 32.88 y para el protocolo P2 es de s/ 33.64.

El costo total del embrión en este trabajo de investigación en promedio es de s/ 300.00, este precio varía de acuerdo al número de embriones que produce una vaca donadora.

CONCLUSIONES

Aplicando el protocolo de superovulación se pudo obtener, de la donadora Gloria 14 embriones, Lulú 8 embriones y Dorina 11 embriones, haciendo un total de 33 embriones.

Aplicando los protocolos de vitrificación se pudo obtener, con el protocolo 1 un total de 7 embriones y con el protocolo 2 se obtuvo 10 embriones los que son considerados como embriones viables de calidad 1 y 2 según su clasificación morfológica, posteriormente se obtuvo 6 embriones con el protocolo 1 y 3 embriones con el protocolo 2 los que son considerados como embriones no viables de calidad 3 y 4.

Realizada la prueba de comparación múltiple de Duncan ($P \leq 0.05$) encontramos que el estadio E5 obtuvo mayor número de embriones de calidad 1 con 5 embriones, y como también se encontró que el estadio E5 obtuvo mayor número de embriones de calidad 2 con 5 embriones, y por último obteniendo diferencia significativa entre el protocolo 1 y el protocolo 2, prueba realizada al 95% de probabilidad.

Los embriones clasificados según su calidad 1 y 2, fueron transferidos a las vacas receptoras en dos grupos de 6 vacas por cada protocolo.

El porcentaje de preñez obtenido fue de 33.33% con el protocolo 1 y 66.67% de preñez con el protocolo 2, se concluye que con el uso del protocolo 2 se obtiene mayor porcentaje de embriones de buena calidad y también mayor porcentaje de preñez.

El costo de la vitrificación por cada embrión con el protocolo 1 es de s/ 32.88, y con el protocolo 2 es de s/ 33.64.

RECOMENDACIONES

Para la vitrificación de embriones se recomienda utilizar etilenglicol más glicerol como medios de vitrificación.

En embriones producidos *in vivo*, es factible emplear la vitrificación como método de criopreservación en trabajos de campo donde no se disponga de equipos de congelación programables.

Se recomienda realizar otras investigaciones para evaluar tasas de gestación y compararlas con los resultados obtenidos con embriones vitrificados.

En el caso de los embriones producidos *in vivo* e *in vitro* es recomendable ensayar nuevos protocolos de criopreservación que aporten resultados superiores para favorecer la comercialización a gran escala de este tipo de embriones.

REFERENCIAS

- ABS. 2006. A.I. Management Manual. Fifth Edition. Volume 2. Wisconsin, USA.
- Ávila P., Madero J., López C., León M., Acosta L., Gómez C., Delgado L., Gómez C., Lozano J. y Reguero M. 2006. Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de obstetricia y ginecología, 57(4): 291-300.
- Arav A., Zeron Y. and Ocherenty A. 2000. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 53: 247.
- Aspron, M.; 2004; Curso de Actualizacion – Manejo Reproductivo del Ganado Bovino; UNA, Mexico.
- Bejar M. and Gatus F. 2002. Nonenquilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled Straw procedure. *Theriogenology* 58:1541-1552.
- Bernal RJ. 1979. Sistema Químico Biológico. Revista ESSO Agrícola No. 2, abril - junio: 28-34.
- Boiso Fedurovsky Irene. 2001. Efecto de la criopreservación sobre la estructura del huso meiótico de ovocitos humanos madurados in vitro. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Burnside EB. 1992. Estrategias globales de selección en los bovinos de leche. *Frisona Española*. 62: 37-40.
- Broadbent PJ, StewartMand Dolman DF. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* 35 (1): 125-139.
- Cabodevila J., 2007. Diagnóstico De Gestación. *gestacion.pdf*. 4 paginas.
- Cabrera P, A. fernandes, P. Bastidas, M. Molina, A. Betencourt and T. Diaz. 2006. Vitrificacion: Una alternativa para la Criopreservacion de Embriones *Fac Cienc Vet* v. 47.

- Callensen H, Lovendahl P, Bak A, Greve T. 1995. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim Sic* 73: 1539-1543
- Cervera R, Garcia-Ximenez F. 2003. Vitrification of zona-free rabbit expanded or hatching blastocysts: a possible model for human blastocysts. *Human Reprod* 18 (10): 2151-2156
- Celestinos M. y Gatica R. 2002. Vitrificación como técnica de criopreservación de embriones bovinos. *Arch. Med. Vet.* [Online], 34(2):157-165.
- De Armas, R. 2007. Transferencia de embriones en el ganado bovino. Panamá: Universidad de Panamá, 117 p.
- De la Fuente J., Monge A., Cocero MJ. y Barragan C. 1989b. Producción y conservación de embriones vacunos. 4º Congreso Internacional de Reprod. Anim. e I.A. León. p. 58.
- De la Fuente J., Cocero M.J., López Sebastián A. y Barragan C. 1988b. Efecto de la utilización de distintas gonadotropinas exógenas (FSH y PMSG) sobre la cantidad y calidad de los embriones producidos por la hembra vacuna. *ITEA* 79: 3-11.
- Dobrinsky JR. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*. 45: 17-26.
- Duica, A. 2010, Efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos.
- Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S., Biramane J. and Englert Y. 2000. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of 35 slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum. Reprod.*, 15(4): 905-910.
- Fahning, M.L; García, M.A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals *ryobiology* 29: 118, 1992.

- Ferrè L, Kaiser G, Canodeville J, Lopez N, Aller J, Palma G, Alberio R. 2002. Effect of age and stage of embryo development on post – cryopreservation embryo survival of in vitro bovine embryos. *Theriogenology* 57(1): 301 – 306.
- Garcia, D. 2008. Evaluacion de embriones post superovulacion en vacas brown swiss.
- Gordon, I. 1996. *Reproduction in Cattle & Buffaloes. Volume 4.* Ed. CAB International. Wallingford, UK. 492 p.
- Gorlach, A.; 1997; *Tranferencia de embriones en ganado vacuno; Primera edición; editorial ACRIVIA S.A.; Zaragoza, España.*
- Grossmann M. and Santaló J. 1991. Aspectos basicos de la congelación de embriones. *Treb. Soc. Cat. Biol.*, 42: 87-108.
- Hafez, E.S.E. 2002, *Reproduccion e Inseminacion Artificial en animales. Septima Edición.* Mexico: McGRAW-HILL INTERAMERICANA, pág. 417. ISBN 970-10-3719-7
- Hafez, E. 1996. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.* Interamericana McGRAW - HiLL. 6a. ed. 542 p.
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Foote RH. 1987. Effect of donor recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27: 139.
- Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote H. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*.19: 83-99.
- Hincapié, J. 2005, *Reproduccion Animal Aplicada: Fundamentos de Fisiologia y Biotecnologia.* Segunda Edición. Honduras: Litocom Editores, ISBN 99926-29-26-6.
- Hincapié, J. 2004. *Anatomía y fisiología de los animales domésticos.* Ed. Litocom. Tegucigalpa, Honduras. 167 p.
- Illera, M. 1994. *Reproducción de los animales domésticos.* Ed. AEDOS. Madrid, España. 390 p.

- IETS. Manual. 2000. Ed.: Stringfellow Da and Seidel SM. Champaign, USA. 79 pp.
- Karow A. 2001. Cryobiology 2001 for mammalian embryologists. En: www.Xytex.com.
- Kuwayama M. 2007. Highly efficient vitrification for criopreservation of human oocytes and embryos: The CrioTop method. *Theriogenology*, 67: 73-80.
- Kuleshova L.L., Mac Farlene D. R., Trounson A. O. and Shaw J. N. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38: 119-130.
- Lindsell CE, Murphy BD, Mapletoft RJ. 1986. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26: 209-219.
- Mariana JC. 1980. Some remarks on the long-term trends and some short regulations in the follicular growth. 9th Inter. Cong. on Anim. Reprod. and A.I. Madrid, España. II: 79-94.
- Massimiliano, E. 2009, Manual de Reproducción en ganado vacuno. Primera Edición. España: Servet editorial, ISBN 978-84-934736-0-0.
- Massip, A; Van der Zwalmen, P, Scheffen B; y col. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo Letters*, 7: 270-273.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol*, 247: C125-C142.
- Moor RM, Osborn J, Crosby I. 1985. Gonadotrophin-Induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod.Fertil.*74:167.
- Mucci, N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*; 65:1551-1562.
- Newcomb R., Rowson LEA. and Trounson A. 1976. The entry of superovulated eggs into the uterus. In "Eggs transfer in cattle" CEE Seminar 1-18.

- Osorio F. 2004. Efecto del manejo alimentario sobre el sistema especializado de producción lechera. En: memorias Seminario Nacional de Lechería Especializada: Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad. Eventos y Asesorías Agropecuarias, Auditorio de la Salud, Hospital General de Medellín, Septiembre 1y 2: 141 ± 152.
- Ortiz, I., y Calderón, D. 2001. Eficiencia en la concepción de dos técnicas de inseminación artificial en vacas Brown swiss y criollas (Tesis pregrado). Universidad Nacional del Altiplano Facultad de Ciencias Agrarias Puno Perú.
- Palma, G. 2008. Biotecnología de la reproducción. 2da. Edición, Argentina, 668 p.
- Palasz, AT; Mapletof RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances.*; 14: 127-149.
- Parks J.E. and Ruffing N.A. 1992. Factor affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriyogenology*, 37: 59-73.
- Pedro P, Yocoyama E, Zhu S, Yoshida N, Valdez D, Tanaka M, Dashing K, Kasai M. 2005. Permeability of Mouse oocytes and embryos at varios developmental stages to five cryoprotectants. *J Reprod Dev* 51: 235-246
- Pereira R, Marques C. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Banking*. Review paper.
- Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim Reprod Sci* 28:237-245.
- Ramírez GL. 2003. Pasto maralfalfa, un manjar para los hatos ganaderos. *El Colombiano*, sábado 16 de agosto, 4b.
- Seidel G.E. 1980. Critical review of embryo transfer procedures with cattle. In: *Fertilization and Embryonic Development "in vitro"*. Ed. Mastroianni L. and Biggers J.D. Plenum Press. 323-353.
- Shaw J.M., Oranratnachai A. and Trounson, A.O. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriyogenology*, 53(1): 59-72.

- Thibier M. and Nibart M. 1987. Disease control of embryo importations. *Theriogenology* 27: 37-47.
- Ushijima J. and Kuwayama M. 2004. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *J Reprod Dev.*, 50: 685-96.
- Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 357-364.
- Vajta, G; Holm, P, Greve, T; y col. 1997. Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in straw rehydration. *J. Reprod. Fertil.* 111: 65-70.
- Vasquez M, Cervantes M, Cordero A, Cardenas O, Huanca T, Huanca W. 2007. Vitrificación de embriones de alpacas: Estudio preliminar. APPA_ALPA. Cusco-Perú.
- Vila L. 1984. Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol. Clin. Hematol.*, 6: 227-236.
- Viudes de Castro M., C. Cortell and J. Vicente. 2010. Dextran Vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. *Theriogenology* 74:1623-1628.
- Wilmut, I, Rowson, L.E.A. Experiments on the lowtemperature preservation of cow embryos. *Vet. Records*, 92: 686-690, 1973.
- Yang, NS; Lu, K.H; Gordon, I; y col. 1992. Vitrification of bovine blastocysts produced in-vitro. *Theriogenology* 37: 326 abstr.

ANEXOS

Anexo 1. Panel fotográfico



Foto 1. Selección de las vacas criollas receptoras de embriones

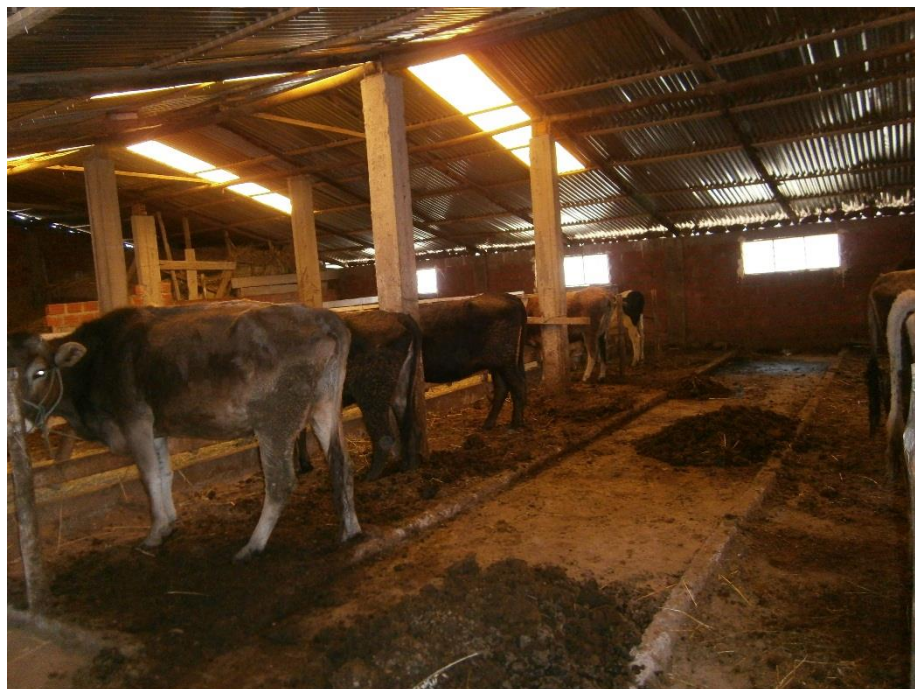


Foto 2. Selección de las vacas Brown Swiss donadoras de embriones



Foto 3. Producción de pasto maralfalfa bajo invernadero para la suplementación de las vacas donadoras



Foto 4. Corte del pasto maralfalfa para su picado y alimentar las vacas donadoras



Foto 5. Preparación del dispositivo CIDR para la sincronización de donadoras



Foto 6. Detección de celo de las vacas donantes y receptoras



Foto 7. Inseminación de las vacas donadoras de embriones



Foto 8. Laboratorio transferencia de embriones



Foto 9. Hormonas y medios de producción, vitrificación y transferencia de embriones



Foto 10. Preparación de medios y materiales para la colección de embriones

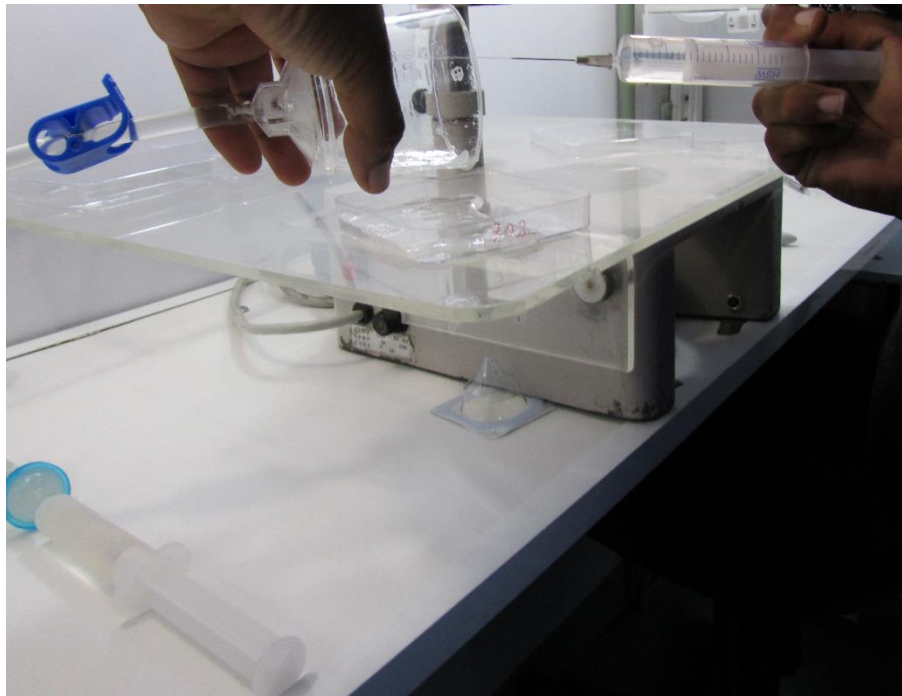


Foto 11. Enjuague del filtro con los embriones en la placa Petri cuadriculada



Figura 12. Búsqueda y clasificación de los embriones



Foto 13. Embriones obtenidos en una colecta

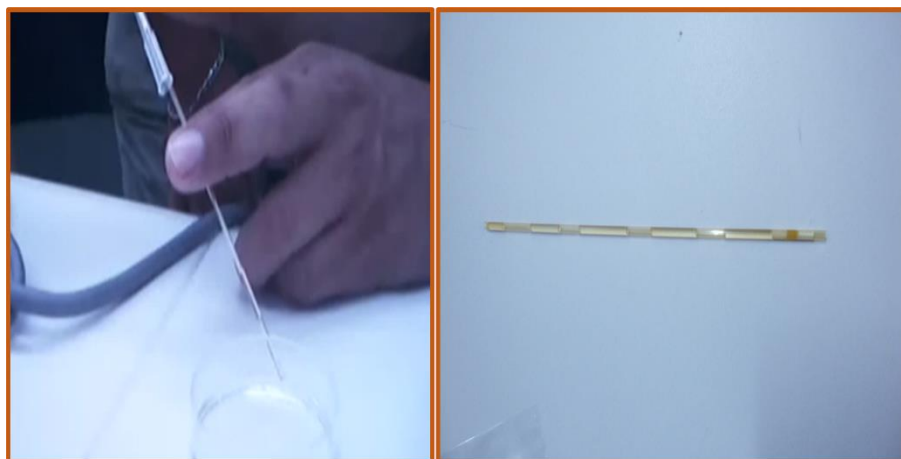


Figura 14. Empajillado de los embriones antes de la vitrificación

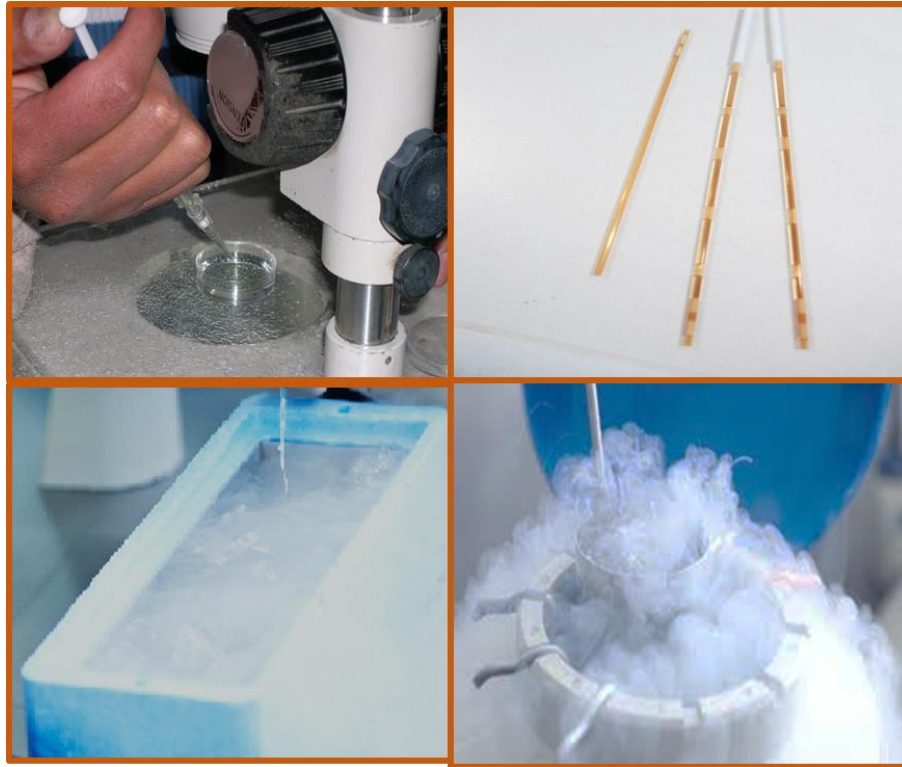


Figura 15. Procedimientos de la vitrificación de los embriones



Figura 15. Desvitrificación de los embriones



Figura 16. Embriones en medio de mantenimiento luego de la desvitrificación



Figura 17. Cargado de los embriones a la funda de transferencia



Figura 18. Transferencia del embrión a vacas receptoras

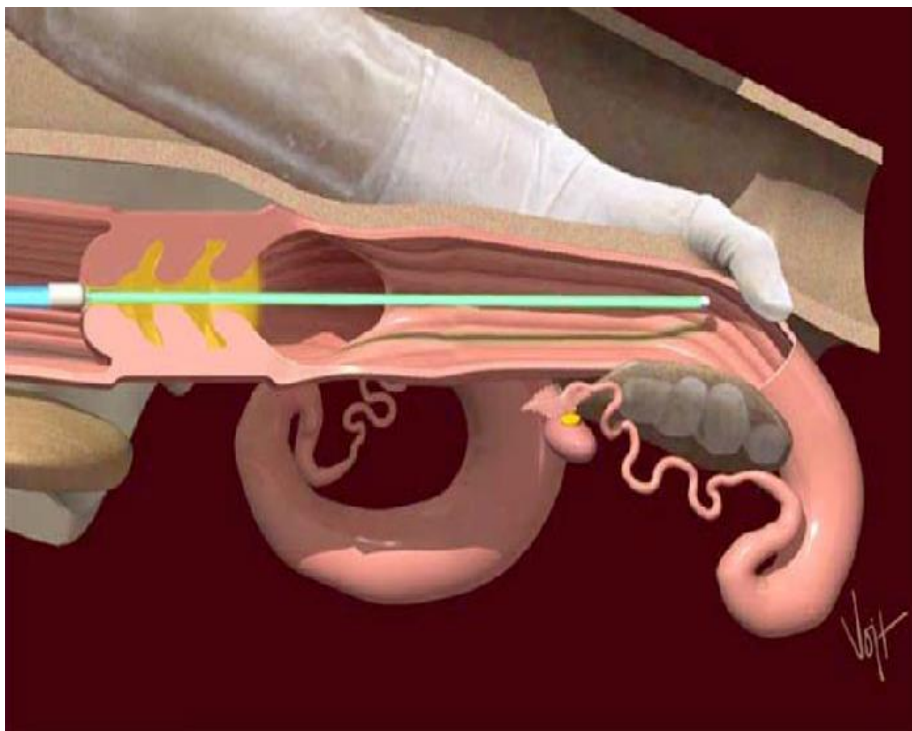


Figura 19: Lugar donde se deposita el embrión

Anexo 2. Número de embriones colectados de las tres donadoras

| DONADORA Nº 1 GLORIA | | | | | Total de embriones colectados |
|--------------------------------------|----------------------------|----|----|----|-------------------------------|
| Embriones según Estado de Desarrollo | Embriones según su calidad | | | | |
| | C1 | C2 | C3 | C4 | |
| E4 | 3 | 0 | 1 | 0 | 4 |
| E5 | 2 | 1 | 1 | 1 | 5 |
| E6 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| E7 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| | 7 | 2 | 3 | 2 | 14 |

| DONADORA Nº 2 LULU | | | | | Total de embriones colectados |
|--------------------------------------|----------------------------|----|----|----|-------------------------------|
| Embriones según Estado de Desarrollo | Embriones según su calidad | | | | |
| | C1 | C2 | C3 | C4 | |
| E4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| E5 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| E6 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| E7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 3 | 0 | 0 | 8 |

| DONADORA Nº 3 DORINA | | | | | Total de embriones colectados |
|--------------------------------------|----------------------------|----|----|----|-------------------------------|
| Embriones según Estado de Desarrollo | Embriones según su calidad | | | | |
| | C1 | C2 | C3 | C4 | |
| E4 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| E5 | 3 | 1 | 1 | 0 | 5 |
| E6 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| E7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 6 | 3 | 2 | 0 | 11 |

Anexo 3. Número de embriones

Embriones excelentes (calidad 1)

| Repeticiones | Protocolo 1 | | | | protocolo 2 | | | |
|--------------|-------------|----|----|----|-------------|----|----|----|
| | E4 | E5 | E6 | E7 | E4 | E5 | E6 | E7 |
| 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

Embriones buenos (calidad 2)

| Repeticiones | Protocolo 1 | | | | Protocolo 2 | | | |
|--------------|-------------|----|----|----|-------------|----|----|----|
| | E4 | E5 | E6 | E7 | E4 | E5 | E6 | E7 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

Embriones regulares (calidad 3)

| Repeticiones | Protocolo 1 | | | | Protocolo 2 | | | |
|--------------|-------------|----|----|----|-------------|----|----|----|
| | E4 | E5 | E6 | E7 | E4 | E5 | E6 | E7 |
| 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Embriones malos (calidad 4)

| Repeticiones | Protocolo 1 | | | | Protocolo 2 | | | |
|--------------|-------------|----|----|----|-------------|----|----|----|
| | E4 | E5 | E6 | E7 | E4 | E5 | E6 | E7 |
| 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Anexo 4. Clasificación de embriones según su calidad y estado de desarrollo previtrificados

| DONADORAS | Embriones según su estado de desarrollo | | | | Total de embriones |
|-------------------|---|----|----|----|--------------------|
| | E4 | E5 | E6 | E7 | |
| Gloria 012 | 4 | 5 | 3 | 2 | 14 |
| Lulu 015 | 3 | 3 | 2 | 0 | 8 |
| Dorina 010 | 3 | 5 | 2 | 1 | 11 |
| total | 10 | 13 | 7 | 3 | 33 |

E4 = Mórulas

E5 = Blastocisto temprano

E6 = Blastocisto maduro

E7 = Blastocisto expandido

| DONADORAS | Embriones según su calidad | | | | Total de embriones |
|---------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| | Calidad 1 | Calidad 2 | Calidad 3 | Calidad 4 | |
| Gloria | 7 | 2 | 3 | 2 | 14 |
| Lulu | 5 | 3 | 0 | 0 | 8 |
| Dorina | 6 | 3 | 2 | 0 | 11 |
| total | 18 | 8 | 5 | 2 | 33 |

Anexo 5. Clasificación de embriones según su calidad y estado de desarrollo post vitrificación

Protocolo 1

| Embriones según Estado de | Clasificación de los embriones según su calidad | | | | TOTAL |
|---------------------------|---|-----------|-----------|-----------|-------|
| | calidad 1 | calidad 2 | calidad 3 | calidad 4 | |
| E4 | 2 | 1 | 1 | 0 | 4 |
| E5 | 1 | 2 | 0 | 2 | 5 |
| E6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| E7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| TOTAL | 3 | 4 | 2 | 4 | 13 |

Protocolo 2

| Embriones según Estado de | Clasificación de los embriones según su calidad | | | | TOTAL |
|---------------------------|---|-----------|-----------|-----------|-------|
| | calidad 1 | calidad 2 | calidad 3 | calidad 4 | |
| E4 | 3 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| E5 | 2 | 3 | 0 | 0 | 5 |
| E6 | 0 | 1 | 2 | 0 | 3 |
| E7 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| TOTAL | 5 | 5 | 3 | 0 | 13 |

Anexo 6. Costos de la vitrificación con protocolo 1 y protocolo 2

| MATERIALES Y MEDIOS DE VITRIFICACION | COSTO POR PROTOCOLO | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|---------|------------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|---|
| | P1 (Propilenglicol + glicerol) | | | | | P2 (Etilenglicol + glicerol) | | | | |
| | UM | canti dad | costo unitari o | sub total en S/. | | UM | canti dad | costo unitari o | sub total en S/. | % |
| COSTOS VARIABLES | | | | 277.38 | | | | 287.38 | 53.48 | |
| Materiales de vitrificación | | | | 132.20 | | | | 132.20 | 24.60 | |
| Pajillas ¼ cc. | Paquete | 1.5 | 9.00 | 13.50 | Paquete | 1.5 | 9.00 | 13.50 | 2.51 | |
| Conector de pajillas para identif ¼ cc. | Paquete | 0.25 | 30.00 | 7.50 | Paquete | 0.25 | 30.00 | 7.50 | 1.40 | |
| Pajilla ½ cc. no esteril para identificación | Ciento | 0.12 | 60.00 | 7.20 | Ciento | 0.12 | 60.00 | 7.20 | 1.34 | |
| Cajas petri NunC 4 compartimientos 4/Pkg | Paquete | 0.5 | 20.00 | 10.00 | Paquete | 0.5 | 20.00 | 10.00 | 1.86 | |
| Cajas Petri redondas 10 x 35 mm, 20/pkg | Paquete | 0.25 | 37.50 | 9.38 | Paquete | 0.25 | 37.50 | 9.38 | 1.74 | |
| Punta de pipeta | Caja | 0.25 | 54.00 | 13.50 | Caja | 0.25 | 54.00 | 13.50 | 2.51 | |
| Jeringas air tite 10 c.c. caja de 100 | Ciento | 0.12 | 126.00 | 15.12 | Ciento | 0.12 | 126.00 | 15.12 | 2.81 | |
| caja de tecno port | Unidad | 0.5 | 10.00 | 5.00 | Unidad | 0.5 | 10.00 | 5.00 | 0.93 | |
| Filtros milipore acrodiscos 1 pieza | Unidad | 2 | 25.50 | 51.00 | Unidad | 2 | 25.50 | 51.00 | 9.49 | |
| Medios vitrificación de embriones | | | | 145.18 | | | | 155.18 | 28.88 | |
| Nitrogeno liquido | kilo | 2 | 12.00 | 24.00 | kilo | 2 | 12.00 | 24.00 | 4.47 | |
| Vigro Bioniche Medio de Mantenimiento | sachet | 0.5 | 52.00 | 26.00 | sachet | 0.5 | 52.00 | 26.00 | 4.84 | |
| Glicerol medio congelacion | sachet | 0.5 | 60.00 | 30.00 | sachet | 0.5 | 60.00 | 30.00 | 5.58 | |
| propilenglicol | Frasco | 0.5 | 55.00 | 27.50 | | | | | 0.00 | |
| etilenglycol | | | | | sachet | 0.5 | 75.00 | 37.50 | 6.98 | |
| Vigro Bioniche sacaroza | Frasco | 0.5 | 75.36 | 37.68 | Frasco | 0.5 | 75.36 | 37.68 | 7.01 | |

| MATERIALES Y MEDIOS DE VITRIFICACION | COSTO POR PROTOCOLO | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|--------|------------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|---|
| | P1 (Propilenglicol + glicerol) | | | | | P2 (Etilenglicol + glicerol) | | | | |
| | UM | canti dad | costo unitari o | sub total en S/. | | UM | canti dad | costo unitari o | sub total en S/. | % |
| COSTOS FIJOS | | | | 250.00 | | | | 250.00 | 46.52 | |
| Personal especializado | Global | 1 | 100.00 | 100.00 | Global | 1 | 100.00 | 100.00 | 18.61 | |
| alquiler de equipos y laboratorio | Global | 1 | 150.00 | 150.00 | Global | 1 | 150.00 | 150.00 | 27.91 | |

| COSTOS | COSTO POR PROTOCOLO | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------|--|--|--|--|------------------------------|--|--|--|--|
| | P1 (Propilenglicol + glicerol) | | | | | P2 (Etilenglicol + glicerol) | | | | |
| COSTOS VARIABLES | 277.38 | | | | | 287.38 | | | | |
| COSTOS FIJOS | 250.00 | | | | | 250.00 | | | | |
| costo total de la vitrificación | 527.38 | | | | | 537.38 | | | | |
| costo de vitrificación por embrion | 40.57 | | | | | 41.34 | | | | |

Anexo 7. Registro de campo de las vacas donadoras y receptoras

TESIS TESISTA: FREDY QUISPE Q.

REGISTRÓ DE CAMPO DE SUPEROVULACION DE VACAS DONADORAS

FECHA DE COLECTA 29-02-18 ESTABLO Santiago PROPIETARIO Fredy Quispe

| identificacion | raza | E. base | superovulacion | | | inseminacion | | O.D. | O.I. | E. fertiles | Ovulos | degenerados | transferibles | vitricados |
|----------------|------|----------|----------------|---------|----------|--------------|----------|------|------|-------------|--------|-------------|---------------|------------|
| | | | inicio | hormona | dosis | semental | servicio | | | | | | | |
| Glora | B.S. | 0.500 mg | 12:00 PM | PLUSET | 1.5, 2.0 | Salitario | I II III | CL 8 | CL 4 | 14 | 1 | - | 9 | 9 |
| Lulu | B.S. | 0.500 mg | 12:00 PM | PLUSET | 1.5, 2.0 | Salitario | I II III | CL 6 | CL 5 | 8 | 3 | - | 8 | 8 |
| Dorina | D.S. | 0.500 mg | 12:00 PM | PLUSET | 1.5, 2.0 | Salitario | I II III | CL 7 | CL 7 | 11 | 2 | - | 9 | 9 |

| identificacio | inseminacion | | | recoleccion | | | |
|---------------|--------------|-------------------------|----------|-------------|------------|--------------------|--------------|
| | fecha | hora | duracion | inicio | finalizado | medio de coleccion | tecnico |
| Glora | 16-02-18 | 4:30 PM - 12:00 PM 8 AM | 12 horas | 16:20 pm | 15:50 pm | Complete FLUS H | Fredy Quispe |
| Lulu | 16-02-18 | 8:00 PM - 11:00 PM 7 AM | 12 horas | 16:20 pm | 17:00 pm | Complete FLUS H | Fredy Quispe |
| Dorina | 16-02-18 | 3:30 PM - 10:30 PM 7 AM | 12 horas | 18:00 pm | 18:00 pm | Complete FLUS H | Fredy Quispe |

OBSERVACIONES:

TESIS TESISTA: FREDY QUISPE Q.

HOJA DE CAMPO

REGISTRO DE EMBRIONES COLECTADOS

ESTABLO: Santiago

Donadora: Glora

Semental: Salitario

N° de embriones: 14 embriones cole.

fecha: 23-02-2018

| pajilla | estad | calidad | pajilla | estad | calidad |
|---------|-------|---------|---------|-------|---------|
| 1 | 4 | 2 | | | |
| 2 | 4 | 1 | | | |
| 3 | 4 | 1 | | | |
| 4 | 4 | 1 | | | |
| 5 | 5 | 1 | | | |
| 6 | 5 | 1 | | | |
| 7 | 5 | 2 | | | |
| 8 | 5 | 3 | | | |
| 9 | 5 | 4 | | | |
| 10 | 6 | 1 | | | |
| 11 | 6 | 2 | | | |
| 12 | 6 | 4 | | | |
| 13 | 7 | 1 | | | |
| 14 | 7 | 3 | | | |

N° de morulas: 3(4-1) 1(4-3)

N° blastocistos tempranos: 2(5-1) 1(5-2) 1(5-3)

N° blastocistos maduros: 1(6-1) 2(6-2) 1(6-3)

N° blastocistos expandidos: 1(7-1) 1(7-3)

Donadora: Lulu

Semental: Salitario

N° de embriones: 8 embriones cole.

fecha: 23-02-2018

| pajilla | estad | calidad | pajilla | estad | calidad |
|---------|-------|---------|---------|-------|---------|
| 1 | 4 | 1 | | | |
| 2 | 4 | 1 | | | |
| 3 | 4 | 1 | | | |
| 4 | 5 | 1 | | | |
| 5 | 5 | 2 | | | |
| 6 | 5 | 2 | | | |
| 7 | 6 | 1 | | | |
| 8 | 6 | 2 | | | |

N° de morulas: 3(4-1)

N° blastocistos tempranos: 1(5-1) 2(5-2)

N° blastocistos maduros: 1(6-1) 1(6-2)

N° blastocistos expandidos:

Donadora: Dorina

Semental: Salitario

N° de embriones: 11 embriones coleccionados

fecha: 23-02-2018

| pajilla | estad | calidad | pajilla | estad | calidad |
|---------|-------|---------|---------|-------|---------|
| 1 | 4 | 1 | | | |
| 2 | 4 | 1 | | | |
| 3 | 4 | 1 | | | |
| 4 | 5 | 1 | | | |
| 5 | 5 | 1 | | | |
| 6 | 5 | 1 | | | |
| 7 | 5 | 2 | | | |
| 8 | 5 | 3 | | | |
| 9 | 6 | 2 | | | |
| 10 | 6 | 2 | | | |
| 11 | 7 | 1 | | | |

N° de morulas: 2(4-1) 1(4-3)

N° blastocistos tempranos: 3(5-1) 1(5-2) 1(5-3)

N° blastocistos maduros: 2(6-1) 2(6-2)

N° blastocistos expandidos: 1(7-1)

TESIS

TESISTA: FREDY Q

HOJA DE CAMPO

Fecha: 23-02-2018

REGISTRO DE VITRIFICACION DE EMBRIONES

Protocolo 1. (Propilugl + Glicero)

Protocolo 2. (Etilugl + Glicero)

| pajilla | estado | calidad | donadora | semental | medio de vitrificacion |
|---------|--------|---------|----------|-----------|------------------------|
| 1 | 4 | 2 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 2 | 4 | 2 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 3 | 4 | 2 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 4 | 4 | 2 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 5 | 5 | 2 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 6 | 5 | 2 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 7 | 5 | 2 | Lulu | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 8 | 5 | 2 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 9 | 5 | 2 | Lulu | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 10 | 6 | 2 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 11 | 6 | 2 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 12 | 6 | 2 | Lulu | Solitario | Propilugl + Glicero |
| 13 | 7 | 1 | Gloria | Solitario | Propilugl + Glicero |

| pajilla | estado | calidad | donadora | semental | medio de vitrificacion |
|---------|--------|---------|----------|-----------|------------------------|
| 1 | 4 | 2 | Lulu | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 2 | 4 | 2 | Lulu | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 3 | 4 | 2 | Dorina | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 4 | 4 | 2 | Dorina | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 5 | 5 | 2 | Dorina | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 6 | 5 | 2 | Dorina | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 7 | 5 | 2 | Dorina | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 8 | 5 | 2 | Lulu | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 9 | 5 | 2 | Dorina | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 10 | 6 | 2 | Lulu | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 11 | 6 | 2 | Dorina | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 12 | 6 | 2 | Dorina | Solitario | Etilugl + Glicero |
| 13 | 7 | 2 | Dorina | Solitario | Etilugl + Glicero |

observaciones... los embriones vitrificados con ambos protocolos se clasificaron únicamente los de calidad 1 y 2 para obtener mayores % de viabilidad de los embriones.

TESIS

TESISTA: FREDY QUIS

HOJA DE CAMPO

Fecha: 16-03-18

Fecha: 23-03-18

REGISTRO DE DESVITRIFICACION DE EMBRIONES

Protocolo 1. (Pg + G)

Protocolo 2. (Eg + G)

| pajilla | estado | calidad | donadora | semental | medio de vitrificacion |
|---------|--------|---------|----------|-----------|------------------------|
| 1 | 4 | 2 | Gloria | Solitario | Pg + G |
| 2 | 4 | 2 | Gloria | Solitario | Pg + G |
| 3 | 4 | 2 | Lulu | Solitario | Pg + G |
| 4 | 4 | 3 | Gloria | Solitario | Pg + G |
| 5 | 5 | 2 | Gloria | Solitario | Pg + G |
| 6 | 5 | 2 | Gloria | Solitario | Pg + G |
| 7 | 5 | 2 | Lulu | Solitario | Pg + G |
| 8 | 5 | 4 | Gloria | Solitario | Pg + G |
| 9 | 5 | 4 | Lulu | Solitario | Pg + G |
| 10 | 6 | 2 | Gloria | Solitario | Pg + G |
| 11 | 6 | 3 | Lulu | Solitario | Pg + G |
| 12 | 6 | 4 | Gloria | Solitario | Pg + G |
| 13 | 7 | 4 | Gloria | Solitario | Pg + G |

| pajilla | estado | calidad | donadora | semental | medio de vitrificacion |
|---------|--------|---------|----------|-----------|------------------------|
| 1 | 4 | 2 | Lulu | Solitario | Eg + G |
| 2 | 4 | 2 | Dorina | Solitario | Eg + G |
| 3 | 4 | 2 | Dorina | Solitario | Eg + G |
| 4 | 4 | 2 | Lulu | Solitario | Eg + G |
| 5 | 5 | 2 | Dorina | Solitario | Eg + G |
| 6 | 5 | 2 | Dorina | Solitario | Eg + G |
| 7 | 5 | 2 | Dorina | Solitario | Eg + G |
| 8 | 5 | 2 | Lulu | Solitario | Eg + G |
| 9 | 5 | 2 | Dorina | Solitario | Eg + G |
| 10 | 6 | 2 | Lulu | Solitario | Eg + G |
| 11 | 6 | 3 | Dorina | Solitario | Eg + G |
| 12 | 6 | 3 | Dorina | Solitario | Eg + G |
| 13 | 7 | 3 | Dorina | Solitario | Eg + G |

observaciones... En la desvitrificación de los embriones se obtuvo con el protocolo 1 18 embriones viables y en el protocolo 2 se obtuvo 10 embriones viables obteniendo un total de 18 embriones viables.

TESIS

TESISTA: FREDY QUISPE

HOJA DE CAMPO

REGISTRÓ DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES VITRIFICADOS A VACAS RECEPTORAS

FECHA: 16-03-2018

FECHA: 23-03-18

| embriones vitrificados con el protocolo 1 (propilenglicol + glicerol) | | | | | | embriones vitrificados con el protocolo 2 (etilenglicol + glicerol) | | | | | | | |
|---|----------------|-----------|---------|----------|----------|---|--------|----------------|-----------|---------|----------|----------|---------------|
| numero | hora del estro | ovario CL | estadio | donadora | hora TE | observaciones | numero | hora del estro | ovario CL | estadio | donadora | hora TE | observaciones |
| 1 | 6:30 am | D+++ | 4-1 | Gloria | 17:30 pm | Celo Natural | 1 | 6:00 pm | D+++ | 4-1 | Lulu | 17:30 pm | Celo Nat. |
| 2 | 8:00 am | D+++ | 4-1 | Gloria | 18:30 pm | Celo Natural | 2 | 5:30 am | D+++ | 4-1 | Dorina | 18:30 pm | Celo Nat. |
| 3 | 6:00 am | O++ | 5-1 | Gloria | 16:30 pm | Celo Natural | 3 | 6:30 am | D+++ | 4-1 | Dorina | 17:30 pm | Celo Nat. |
| 4 | 7:00 am | D+++ | 4-2 | Lulu | 19:00 pm | Celo Natural | 4 | 2:00 am | D+++ | 5-1 | Dorina | 16:30 pm | Celo Nat. |
| 5 | 5:00 am | D+++ | 5-2 | Gloria | 18:00 pm | Celo Natural | 5 | 6:00 am | D++ | 5-1 | Dorina | 16:00 pm | Celo Nat. |
| 6 | 6:30 am | D+++ | 5-2 | Lulu | 17:30 pm | Celo Natural | 6 | 6:00 am | D+++ | 4-2 | Lulu | 17:00 pm | Celo Natural |

observaciones: en la transferencia de los embriones a vacas receptoras se realizó únicamente con embriones viables de calidad 1 y 2 para obtener mayores resultados en el porcentaje de prenes.

Tesis

TESISTA: FREDY QUISPE

Hoja de campo

Diagnóstico de gestación mediante la palpación rectal a los 60 días

FECHA: 15-05-2018

22-05-2018

| vitrificados con el protocolo 1 (propilenglicol + glicerol) | | | | | vitrificados con el protocolo 2 (etilenglicol + glicerol) | | | | |
|---|----------|-----------|---------|---------------|---|----------|-----------|---------|---------------|
| N° | donadora | semental | estadio | observaciones | N° | donadora | semental | estadio | observaciones |
| 1 | Gloria | Solitario | 4-1 | Preñado | 3 | Lulu | Solitario | 4-2 | Vacía |
| 2 | Gloria | Solitario | 4-1 | Preñado | 2 | Lulu | Solitario | 4-1 | Preñado |
| 3 | Gloria | Solitario | 5-1 | Vacía | 3 | Dorina | Solitario | 5-1 | Vacía |
| 4 | Lulu | Solitario | 4-2 | Vacío | 7 | Dorina | Solitario | 4-1 | Preñado |
| 5 | Gloria | Solitario | 5-2 | Vacía | 5 | Dorina | Solitario | 4-1 | Preñado |
| 6 | Lulu | Solitario | 5-2 | Vacía | 6 | Dorina | Solitario | 5-1 | Preñado |

observaciones: en el P1 se obtuvo un total de 2 vacas preñadas y en el P2 se obtuvo un total de 4 vacas preñadas. Esto también puede ser porque con el P2 se usaron más morulas de calidad 1.