

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
VICERRECTORADO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA ANIMAL Y TECNOLOGÍA
CARRERA MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“ESTANDARIZACION DE UN PROTOCOLO DE MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA
DE EMBRIONES EN OVINOS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL DE KALLUTACA”**

PROYECTO FINANCIADO CON RECURSOS PROPIOS
Resolución HCC Nº 001/2021

EQUIPO DE INVESTIGADORES:

MVZ. Vladimir Grover Vargas Pérez
Univ. Marcelo Mamani Paz
Univ. Christian Nina Chipana

EL ALTO – BOLIVIA
2021

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO

AUTORIDADES

Dr. Carlos Condori Titirico

RECTOR

Dr. Efraín Chambi Vargas Ph. D.

VICERRECTOR

Dr. Antonio López Andrade Ph. D.

DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Ing. Laureano Coronel Quispe

**DECANO DE ÁREA DE CIENCIAS AGRICOLAS PECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

Lic. MVZ. Rodolfo Efraín Berdeja Ovidio

DIRECTOR DE CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

M.Sc. Nestor Salazar Layme

COORDINADOR INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

DERECHOS RESERVADOS: Universidad Pública de El Alto

SENAPI:

Dirección UPEA: Av. Sucre s/n Zona Villa Esperanza

Diciembre. 2021

El Alto – Bolivia

PRESENTACIÓN

La Universidad Pública de El Alto, por medio de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, tiene el agrado de presentar el presente trabajo de investigación perteneciente a la línea de investigación de Reproducción y Biotecnología Animal.

La presente línea de investigación tiene como objetivo realizar investigaciones referentes al proceso fisiológico y de biotecnología reproductiva de los animales domésticos, tal es el caso que tengo el honor de presentar el presente trabajo titulado **“ESTANDARIZACION DE UN PROTOCOLO DE MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN OVINOS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL DE KALLUTACA”**, trabajo que tiene la finalidad acelerar los programas de mejoramiento genético tanto en el mismo centro como en los rebaños de los productores de ovinos del departamento de La Paz, pero esta vez transmitiendo la genética materna y paterna al mismo tiempo.

Esta investigación permitirá comprender el proceso metodológico de la Transferencia de embriones, pero sobre todo conocer resultados que permitirán tomar decisiones en el futuro.

De antemano les quedo muy agradecido.

Atentamente.

M.Sc. Nestor Salazar Layme
COORDINADOR

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En primer lugar dar gracias a Dios por darnos un día más de vida, para seguir aplicando el conocimiento desarrollado durante muchos años de trabajo y estudio.

Agradecer a la Universidad Pública de el Alto, por albergarnos dentro sus predios y brindarnos la oportunidad de realizar trabajos de investigación.

Agradecer a la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme dado la oportunidad de trabajar como docente investigador, en bien del desarrollo científico de nuestra carrera.

Agradecer al Instituto de Investigación en Ciencia Animal y Tecnología, por brindarnos el apoyo y asesoramiento durante todo el trabajo de investigación.

Finalmente un agradecimiento al Centro Experimental de Kallutaca y a todos sus técnicos, por el apoyo recibido durante todo el proceso del trabajo de investigación.

MVZ. Vladimir Vargas Pérez
INVESTIGADOR PRINCIPAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INDICE

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL PROBLEMA.....	1
1.2. EL OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
1.2.1. Objetivo General.....	2
1.2.2. Objetivos específicos.....	2
1.3. LA HIPOTESIS DE LA INVESTIGACION	3
1.4. LA JUSTIFICACIÓN	3
CAPITULO II. MARCO TEORICO	4
2.1. MENCIÓN DE OTROS ESTUDIOS RELATIVOS AL TEMA	4
2.1.1. Transferencia de embriones en ovejas Suffolk y Rideau en clima templado	4
2.1.2. Técnicas Reproductivas en Ovinos:Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones en la Empresa OVITEC, Punta Arenas, Chile	4
2.2. MENCIÓN DE LOS PUNTOS DE VISTA DE OTROS INVESTIGADORES	5
2.3. CORRIENTE O ENFOQUE ELEGIDO POR EL INVESTIGADOR.....	6
2.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS FUENTES	6
2.4.1. Anatomía y tracto genital de la oveja	6
2.4.2. Laparoscopia	9
2.4.3. Hormonas de la reproducción bovina que intervienen en la Transferencia de embriones.	10
2.4.4. Técnicas de colección de embriones	13
2.4.5. Medios de colección y mantenimiento	15
2.4.6. Clasificación de los embriones.....	15
2.4.7. Manejo y selección de hembras receptoras.	16
2.4.8. Selección de receptoras	17
2.4.9. Estimulación ovárica para la ovulación múltiple	18
CAPITULO III. MARCO METODOLOGICO.....	20
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	20
3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	20
3.2.1. Análisis estadísticos	20
3.2.2. Variables de la investigación.....	20
3.2.3. Población y muestra.....	20
3.3.4. Ambiente de la investigación	21
3.3.5. Técnicas e instrumentos.....	21

3.3.6. Procedimiento de la investigación.....	23
CAPITULO IV RESULTADOS.....	30
4.1. RESPUESTA MULTIOVUATORIA CON FOLLTROPIN – V EN DOSIS ALTA...	30
4.2. RESPUESTA MULTIOVUATORIA CON FOLLTROPIN – V EN DOSIS BAJA...	32
4.3. RESPUESTA MULTIOVUATORIA CON ECG.....	33
4.4. TASA DE RECUPERACIÓN.....	34
4.5. TASA DE EMBRIONES TRASFERIBLES.....	35
CAPITULO V CONCLUSIONES	36
CAPITULO VI. RECOMENDACIONES	37
6.2. En el ámbito científico	37
6.3. En lo Institucional	37
BIBLIOGRAFIA.....	38
ANEXOS	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	30
<i>Características de respuesta multiovulatoria, en hembras donadoras sincronizadas y estimuladas con Folltropin – V, con una dosis de 133 mg/oveja</i>	30
Tabla 2.	32
<i>Características de respuesta multiovulatoria, en hembras donadoras sincronizadas y estimuladas con Folltropin – V, con una dosis de 100 mg/oveja</i>	32
Tabla 3.	33
<i>Características de respuesta multiovulatoria, en hembras donadoras sincronizadas y estimuladas con eCG (1200 UI).</i>	33
Tabla 4.	34
<i>Tasa de recuperación de embriones por tratamiento</i>	34
Tabla 5.	35
<i>Tasa de embriones transferibles y no transferibles, de acuerdo a cada tratamiento</i>	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	24
Esquema del diseño experimental en base al protocolo con la aplicación de 6 dosis decrecientes de FSH para la estimulación multiovulatoria de la donadora y el protocolo para la receptora.....	24
Figura 2	25
Esquema del diseño experimental en base al protocolo con la aplicación de 8 dosis decrecientes de FSH para la estimulación multiovulatoria de la donadora y el protocolo para la receptora.....	25
Figura 3	26
Esquema del diseño experimental en base al protocolo de aplicación de una sola dosis de eCG para la estimulación multiovulatoria de la donadora y el protocolo para la receptora. .	26

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el centro experimental de Kallutaca, perteneciente a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, con el objetivo de estandarizar un protocolo de multiovulación en ovinos. El trabajo se inició con la selección de hembras donadoras, en un total de 11 ovejas, luego se distribuyó las hembras en 3 grupos, el grupo 1 fueron estimuladas con pFSH (Folltropin – V) en dosis alta y con una aplicación decreciente, el grupo 2 también fue estimulado mediante la aplicación de pFSH pero en dosis baja y con aplicaciones en forma decreciente, finalmente el grupo 3 en el cual se utilizó la hormona eCG en una dosis de 1200 UI en una sola aplicación. Los resultados al final de la investigación fueron los siguientes: el grupo 1 fue el que obtuvo mejores resultados, presentando un promedio de $9 \pm 2,65$ cuerpos lúteos, $6 \pm 1,73$ embriones de los cuales $2,33 \pm 1,53$ fueron de grado 1 y 2 ± 1 de grado 2; la tasa de viabilidad fue del 72,2%. En comparación con los demás grupos, el grupo 1 al análisis estadístico tuvo una diferencia significativa ($P < 0,05$). Finalmente se puede llegar a concluir, indicando que la aplicación de dosis elevadas en ovejas con un condición corporal moderada tiene una mejor respuesta en las donadoras en comparación con dosis bajas, también se puede indicar que la pFSH induce a una mejor respuesta multiovulatoria en comparación de la eCG.

ABSTRACT

The present research work was carried out in the experimental center of Kallutaca, belonging to the Veterinary Medicine and Zootechnics Career, with the aim of standardizing a multiovulation protocol in sheep. The work began with the selection of donor females, in a total of 11 ewes, then the females were distributed in 3 group, group 1 were stimulated with pFSH (Folltropin - V) in high dose and with a decreasing application, the group 2 was also stimulated by the application of pFSH but in a low dose and with decreasing applications, finally group 3 in which the eCG hormone was used in a dose of 1200 IU in a single application. The results at the end of the investigation were as follows: group 1 was the one that obtained the best results, presenting an average of 9 ± 2.65 corpora lutea, 6 ± 1.73 embryos of which 2.33 ± 1.53 were grade 1 and 2 ± 1 grade 2; the viability rate was 72.2%. Compared with the other groups, group 1 at statistical analysis had a significant difference ($P < 0.05$). Finally, it can be concluded, indicating that the application of high doses in sheep with a moderate body condition has a better response in donors compared to low doses, it can also be indicated that pFSH induces a better multiovulatory response compared to the eCG.

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. EL PROBLEMA

La transferencia de embriones viene hacer una biotecnología reproductiva que acelera el mejoramiento genético, especialmente transmitiendo la genética materna en comparación con la inseminación artificial; pero uno de los problemas más frecuentes, es que los protocolos son muy caros y que varios de ellos no tienen una buena respuesta por parte de la oveja donadora, en otras palabras la hembra no responde al protocolo.

La finalidad de la aplicación de esta técnica en los animales domésticos tiene fundamentos de orden genético, comercial, sanitario y de conservación de las especies. En resumen, permite lograr los siguientes objetivos:

- Introducir y difundir rápidamente nuevas razas o genotipos de alto valor productivo. Las características deseables son rápidamente introducidas en la majada o hato en una sola generación. Un ejemplo se presenta con la característica genética del “gen prolífico Booroola” que en la raza Merino ha dado a sus portadores un valor adicional que podría ser rápidamente multiplicado por la TE.
- Reducir riesgos en la transmisión de enfermedades, debido a que en los primeros estadíos de su desarrollo, los embriones presentan una protección natural contra los agentes infecciosos. Esta ventaja comparativa ha favorecido el comercio internacional de embriones congelados.
- Difundir material genético de alto valor comercial con facilidad de adaptación ambiental de las crías a diferentes sistemas de producción y manejo.
- Aumentar el progreso genético en la producción, a través del incremento en la intensidad de selección de las madres destinadas a la producción de machos superiores, al disponer de un mayor número de crías por hembra seleccionada.

- Acortar el intervalo generacional. La posibilidad de obtener descendencia de las madres a temprana edad permite una reducción del intervalo generacional, con mayor beneficio cuando se emplea semen de animales jóvenes.
- Apoyar las técnicas reproductivas en las que interviene la micromanipulación de embriones (determinación del sexo, fecundación “in vitro”, clonación, transgénesis, etc.).
- Conservar razas o especies. La conservación de material genético (embriones congelados) en bancos de germoplasma permite la conservación de genes que de otra manera desaparecerían con la especie.

Por tal razón el presente trabajo de investigación tiene la finalidad de establecer un protocolo de multiovulación y transferencia de embriones que nos permitan mejorar las características genéticas de nuestro rebaño, pero sobre todo iniciar el mejoramiento genético de los rebaños de las diferentes comunidades del departamento de La Paz.

1.2. EL OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1. Objetivo General

Estandarizar un protocolo de multiovulación y transferencia de embriones en ovinos en el centro experimental de Kallutaca.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar las características de respuesta multiovulatoria, número de cuerpos lúteos, número de embriones y calidad embrionaria en hembras donadoras sincronizadas y estimuladas en base a Fulltrophin – V con una dosis mayor.
- Determinar las características de respuesta multiovulatoria, número de cuerpos lúteos, número de embriones y calidad embrionaria en hembras donadoras sincronizadas y estimuladas en base a Fulltrophin – V con una dosis menor.

- Determinar las características de respuesta multiovulatoria, número de cuerpos lúteos, número de embriones y calidad embrionaria en hembras donadoras sincronizadas y estimuladas en base a eCG.

1.3. LA HIPOTESIS DE LA INVESTIGACION

La utilización de diferentes tipos de hormonas nos permitirá tener mejor característica ovárica y embrionaria en las ovejas sometidas a la multiovulación ovárica.

1.4. LA JUSTIFICACIÓN

El potencial natural reproductivo de cada especie y de cada raza es una limitante a la rapidez de difusión del progreso genético. En las condiciones tradicionales de cría ovina, el número de descendientes producidos por hembra y por año es de una o dos crías, por lo tanto durante su vida reproductiva se logran obtener entre 6 a 8 crías. La TE permite incrementar el potencial reproductivo de las hembras de alto valor genético mediante un mayor aprovechamiento de la gran reserva de ovocitos que se encuentran en el ovario. La estimulación hormonal de los ovarios desencadena la OM pudiéndose obtener un número considerable de embriones en un corto período de tiempo.

Estas biotecnologías posibilitan acortar el intervalo generacional y en consecuencia incrementar el avance genético. A su vez, conjuntamente con la inseminación artificial, son excelentes herramientas para el mejoramiento genético de majadas y hatos que se encuentren aislados de los proveedores de reproductores.

Respuestas aceptables en el trabajo permitirán iniciar el mejoramiento genético de nuestros rebaños en el departamento de La Paz, trayendo como resultados mejores ingresos económicos para los productores por el mayor rendimiento productivo de sus animales.

CAPITULO II. MARCO TEORICO

2.1. MENCIÓN DE OTROS ESTUDIOS RELATIVOS AL TEMA

2.1.1. Transferencia de embriones en ovejas Suffolk y Rideau en clima templado

Se realizó la comparación del efecto de la raza en la tasa de ovulación (TO), longitud de los cuernos uterinos (LCU), tasa de recuperación embrionaria (TRE), porcentaje de recuperación del medio lavado (PRM), embriones transferibles (ET), y el porcentaje de gestación (PG) en las receptoras. Para este estudio se utilizaron 30 ovejas de las cuales 9 fueron donadoras (5 Rideau, R y 4 Suffolk, S), con 21 receptoras (8 Rideau, R y 13 Suffolk, S). En la sincronización se usaron esponjas intravaginales insertadas por 12 días, con 20mg de FGA. Las receptoras recibieron 333 UI de eCG el día 1, en cuanto a las donadoras se colocaron 7 dosis de FSH (50, 40, 30, 30, 20, 20 y 10mg), la aplicación fue cada 12 horas, empezando el día 10. Se usó la vía laparoscópica para inseminar a las hembras donadoras, luego el día 7 post-celo se realizó la transferencia de embriones. No hubo diferencias ($P>0.05$) entre ovejas donadoras de la raza Rideau Arcott y Suffolk para TO (26.5 ± 7.67 vs 9 ± 2.52), TCU (22.25 ± 1.76 vs 24.33 ± 2.81), PRM (93.87 ± 2.45 vs 97.5 ± 0.50) y ET (2.25 ± 1.93 vs 1.0 ± 1.0). Tampoco hubo diferencias ($P>0.05$) para TO (2 ± 0 vs 2 ± 0.63) y PG (33.33 ± 33.33 vs 80 ± 20) entre ovejas receptoras Rideau Arcott y Suffolk ($n=8$; 3 R y 5 S). Los resultados no muestran diferencias entre razas en su capacidad de respuesta al tratamiento utilizado (Téllez Rubí, Lopez Aguilar, Juárez Cruz, & Rangel Santos, 2011).

2.1.2. Técnicas Reproductivas en Ovinos: Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones en la Empresa OVITEC, Punta Arenas, Chile

En el estudio realizado en la región de la Patagonia de Chile, se describe los resultados de las principales técnicas de reproducción en ovinos. Esta pasantía fue realizada en la empresa OVITEC, con sede en Punta Arenas, que constantemente está en el uso de estos procesos reproductivos para el mejoramiento genético de su hato, la duración de la investigación fue de 10 semanas empezando en abril y terminando en Julio de 2011, se sincronizaron y detectaron celo a 30,918 hembras de las cuales 30,404 fueron inseminaciones intracervicales, 309 inseminaciones laparoscópicas, 24 lavados uterinos y 205 transferencias de embriones (Molina, 2012).

"ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN OVINOS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL DE KALLUTACA"

La cantidad de ovejas preñadas fue: para inseminación artificial intracervicales 82.9%, inseminación artificial laparoscópica 79.3% y para transferencia de embriones 72.2% (Molina, 2012).

2.2. MENCIÓN DE LOS PUNTOS DE VISTA DE OTROS INVESTIGADORES

Según Morales, Vargas, Salazar, & Mancheno, (2019) en el estudio titulado “Protocolos de superovulación utilizando diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) en la producción de embriones ovinos” llegaron a la conclusión que el el tratamiento II (1500 UI de eCG Folligon®) mostró una mejor respuesta a la superovulación, frente al tratamiento I (1000 UI de eCG Folligon®) y produjo $5,40 \pm 3,02$ CL en las ovejas tratadas, además el tratamiento II mostró mayor número de embriones viables $2,13 \pm 2,30$, frente a $0,63 \pm 1,41$ embriones recuperados del tratamiento I. Este estudio demostró que es posible implementar programas de transferencia de embriones bajo sistemas de crianza extensiva sobre los 2,500 m.s.n.m., permitiéndonos aprovechar este potencial genético de animales que ya poseen adaptación al medio ambiente.

Harasymowycz, Benítez, Morales, Paul, & Checo, (2014) en el trabajo de investigación titulada “Respuesta ovárica a tratamientos superovulatorios con dosis constantes y decrecientes de FSHp evaluada por laparoscopia en ovejas cruza Texel” indican que de la totalidad de cuerpos lúteos observados en ambos tratamientos, CON y DEC, fueron registrados mayor cantidad en los ovarios izquierdos; 62,2% y 54,3%, respectivamente, también indican, que el tratamiento superovulatorio que consistió en dosis decrecientes de FSHp en ovejas cruza Texel, se observó un total de 92 CL, promedio de 18,4 CL por animal. Mientras que la respuesta al tratamiento a dosis constante de la misma hormona resultó en 61 CL totales y 12,2 CL en promedio por animal. La respuesta ovárica a dosis decrecientes de esta hormona demuestra mayor cantidad de cuerpos lúteos en comparación a la de dosis constantes.

En un estudio realizado en Guerrero, Mexico indican que el porcentaje de ovejas Criollas que responde al protocolo hormonal evaluado es moderado, con valores para el número de cuerpos lúteos y de embriones transferibles menores a los informados en la literatura, exhibiendo un alto grado de variación entre individuos. La tasa de fertilidad en las receptoras

es moderada, pero se encuentra dentro de lo esperado (Martínez Rojero, Mejía Villanueva, Zarco Quintero, Mastache Lagunas, & Reyna Santamaría, 2017).

2.3. CORRIENTE O ENFOQUE ELEGIDO POR EL INVESTIGADOR

El trabajo de investigación es de un enfoque positivista, de tipo cuantitativo, debido a que mide el efecto de varios fenómenos, el primero, las diferentes hormonas utilizadas, el proceso de multiovulación, el factor de la receptora. También su resultado se basa en la interpretación del, análisis estadístico y finalmente se realiza un planteamiento de una hipótesis, el cual será aceptado o rechazado en base a los resultados obtenidos.

2.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS FUENTES

2.4.1. Anatomía y tracto genital de la oveja

2.4.1.1. Anatomía

El aparato reproductor de la oveja está formado por: el útero, dos ovarios, dos conductos ováricos, el cérvix, la vagina y la vulva. Similar al útero de la vaca, pero se deben de resaltar cierto número de caracteres especiales. No existe demarcación entre la trompa uterina y el cuerno del útero, las trompas son muy flexuosa cerca del infundíbulo. El útero de la oveja se asemeja al de la vaca, que mide entre 10 a 12 cm y se adelgazan en punta de tal manera que su unión con las trompas uterinas se hace insensiblemente, lo cual no permite distinguir con claridad el punto de separación entre estos dos órganos, los cuernos son ondulados formando una espiral cerrada (Galina & Valencia , 2008).

2.4.1.2. Fisiología

La característica fisiología reproductiva más importante en la oveja es la presencia de un anestro estacional. En donde la actividad ovárica anual se comprende de dos períodos más o menos marcados según sea el lugar donde esta especie se ha desarrollado. Estos períodos son, la época de apareamiento y la estación de anestro. La época de actividad sexual se caracteriza por presentar una serie de estros acompañada de ovulaciones. Si la oveja no queda preñada, estos ciclos siguen siendo en forma regular, lo cual permite a la hembra contar con repetidas oportunidades de copular y quedar preñada. Un ciclo estral normal se considera

cuando su duración es de 14 a 19 días, sin embargo, existe una gran repetición de ciclos más largos y más cortos, al inicio y al final de la época de apareamiento (Aisen, 2004).

El ciclo estral se comprende dos fases que son: La fase folicular y la fase lútea, que están dominadas por la estructura que se encuentra presente en el ovario (Aisen, 2004).

La Fase folicular es un período que se extiende entre la luteólisis y la ovulación (Aisen, 2004). En esta fase la estructura ovárica primaria es el folículo pre-ovulatorio, el cual este produce una gran cantidad de estrógenos y también contiene en su interior al óvulo. Esta fase tiene dos períodos, los cuales son: proestro y el estro (Aisen, 2004).

Proestro: Este periodo dura entre 2 y 5 días dependiendo el tipo de raza. En esta fase se desarrollan varios folículos, de los cuales llegaran a ovular entre 1 a 4 dependiendo de la raza (Hafez, 2002).

Estro: Es el período más fácil de reconocer en la hembra y se caracteriza por el comportamiento que permite el apareamiento, además se observa aumento en la locomoción, inquietud, movimiento de la cola, búsqueda del macho, micciones frecuentes y sobretodo la inmovilidad cuando es montada por el macho, puede observarse también edematización de la vulva y la presencia de un moco viscoso. El celo dura cerca de 30 horas, aunque es muy variable según la raza. Por lo general se considera día 1 del ciclo estral el día de comienzo del estro. La ovulación tiene lugar unas 30 horas después de iniciarse el estro (Galina & Valencia, 2008).

La fase lútea se extiende desde la ovulación hasta la luteólisis, la estructura dominante es o son los cuerpos lúteos y la principal hormona producida por ellos es la Progesterona. La fase lútea presenta dos períodos, el metaestro y el diestro (Gibbons & Cueto, 2013).

Metaestro: Es corto y se inicia después de la ovulación, cuando el folículo se llena de sangre y se transforma en cuerpo hemorrágico y termina cuando este se transforma en cuerpo lúteo o amarillo (Gibbons & Cueto, 2013).

Diestro: Es la fase más extensa del ciclo, puede durar 13 días y se caracteriza por la secreción de progesterona. Si la hembra no ha quedado preñada luego de 11 a 12 días el cuerpo lúteo

sufre la luteólisis, por acción de la prostaglandina F2 α , sintetizada por el útero y aquí finaliza el diestro (Hafez, 2002).

2.4.1.3. Ovogénesis

La Ovogénesis es la producción de óvulos y se realiza en los ovarios (Aisen, 2004). Incluye la formación y la maduración de las células e incluye tres procesos:

Proliferación

Es una etapa fetal, mitótica en la que se forma un número determinado de ovocitos primarios que más tarde van a cumplir una función, pero muchos de ellos desaparecen al momento del nacimiento (Aisen, 2004).

Crecimiento

En esta fase el ovocito aumenta de tamaño, se forma la zona pelúcida, células de la granulosa y células de la teca, los óvulos migran al interior del ovario. Esta es una fase mitótica que comienza antes de la pubertad (Aisen, 2004).

Maduración

Esta etapa se da después de la pubertad, la primera meiosis se da en plena ovulación y la segunda meiosis en el momento de la fertilización. La primera división meiotica da origen al ovocito secundario y la eliminación del primer cuerpo polar. Aquí se lleva a cabo la ovulación. La segunda división meiotica se activa por el nemaspermio en el ovulo y produce al cigoto y al segundo cuerpo polar (Hafez, 2002).

2.4.1.4. Foliculogenesis

La Foliculogénesis es el proceso de crecimiento que experimenta el folículo desde el momento que deja la población de reserva, constituida por folículos primordiales, hasta su ovulación o atresia. Los folículos son reclutados continuamente hasta que la reserva se termina. Los folículos se clasifican en: Folículos primordiales, Folículos preantrales (folículos primarios y secundarios), Folículos antrales y preovulatorios. El folículo ovárico es una unidad altamente

compleja y consiste de distintos tipos de células somáticas. El folículo provee un microambiente para el crecimiento del ovocito y es el responsable para la producción de Hormonas (Galina & Valencia , 2008).

2.4.1.5. Fecundación

La fecundación, o fertilización es un proceso que ocurre por la fusión de dos gametos femenino y masculino. Luego del servicio, los espermatozoides depositados en la vagina anterior deben atravesar las barreras naturales del aparato reproductor de la hembra antes de llevar dicho proceso (Aisen, 2004).

2.4.1.6. Gestación

La gestación corresponde al periodo que transcurre desde la fecundación hasta el momento del parto. La duración de la gestación de oveja es similar, siendo 114-156 días. Esta variación existente puede originarse en factores genéticos (raza e individuo). Maternos (edad), fetales (tamaño y numero de la camada o ambientales (nutrición, temperatura, estación del año) (Aisen, 2004).

2.4.2. Laparoscopia

Una laparoscopia es un procedimiento que usa un médico para observar el interior del abdomen (barriga) y la pelvis. Se hace con un laparoscopio, un tubo delgado y flexible que tiene en un extremo una luz y una pequeña cámara de video. El tubo se introduce a través de una incisión realizada a través de la pared abdominal, cerca del ombligo. También se podría hacer una segunda o una tercera incisión en otras partes del abdomen para insertar otros instrumentos. La laparoscopia también se conoce como cirugía mínimamente invasiva (Gibbons & Cueto, 2013).

2.4.3. Hormonas de la reproducción bovina que intervienen en la Transferencia de embriones.

2.4.3.1. Hormonas liberadoras de Gonadotropinas

Bó et al. (2007), indica que las sustancias que controlan la liberación de las hormonas hipofisarias fueron inicialmente denominadas factores de liberación. A medida que se conocieron sus estructuras químicas, se las ha llamado hormonas liberadoras y su abreviatura genérica es RH. La GnRH es un decapeptido (10 aminoácidos) con un peso molecular de 1.183 Daltons. Esta hormona induce la liberación tanto de la hormona luteinizante (LH) como de la hormona folículo estimulante (FSH) a partir de la hipófisis.

Además (Bó et al., 2007) menciona que, la síntesis de un gran número de análogos estructurales de la GnRH ha tenido gran importancia en el establecimiento de las reacciones de estructura y actividad de esta hormona. Se ha sintetizado dos tipos básicos de análogos de GnRH. Los análogos antagonistas parecen unirse al receptor en la hipófisis pero induce la liberación de LH o FSH, y bloquea la acción de la hormona natural. Los estimulantes inducen la liberación de la LH Y FSH, al igual que la GnRH natural.

Finalmente (Bó et al., 2007) resalta que, la función principal de la GnRH es inducir la síntesis y liberación de LH y FSH. Durante el ciclo estral la GnRH se va a secretar en pulsos.

2.4.3.2. Hormonas hipofisarias gonadotrópicas

La adenohipófisis secreta tres hormonas gonadotróficas: folículos estimulantes, luteinizantes y prolactina.

a. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Hafez E. (1996) y Bó et al. (2007), la hipófisis anterior secreta tres hormonas glucoprotéicas: la FSH, LH y TSH (Hormona Estimulante de la Tiroides). La vida media de la FSH va de 2 a 5 horas.

Bó et al. (2007), en la hembra la FSH estimula el crecimiento de los folículos en el ovario y junto con la LH participa estimulando la síntesis de: estradiol en los folículos en desarrollo. Las

células de la granulosa son las que poseen receptores para la FSH, y producen además de estradiol otra hormona llamada inhibina que actúa junto con el estradiol suprimiendo la liberación de FSH por la hipófisis.

b. Hormona Luteinizante (LH)

Bó, et al. (2007), la LH es una glicoproteína compuesta por una sub-unidad de alfa y otra de beta con un peso molecular de 30000 Daltons y una vida media de 30 minutos los niveles tónicos o basales actúan con la FSH para inducir la secreción de estrógenos de los folículos ováricos. Además menciona que, las células de la teca interna contienen receptores para la LH y mediante su estimulación producen andrógenos, estos luego pasan a través de la membrana basal a las células de la granulosa, donde mediante la acción de la FSH se induce a la degradación de los andrógenos para transformarse en estrógenos. El pico preovulatorio de la LH induce una cadena de reacciones enzimáticas que terminara con la ruptura de la pared folicular y la ovulación. El pico preovulatorio induce la activación del ovocito para que continúe con la meiosis o estimulará la formación del cuerpo lúteo. La LH es la principal sustancia luteotrópica en animales domésticos.

2.4.3.3. Hormonas Gonadales

a. Inhibina

Hafez B. (2002) menciona que, tanto la inhibina A como la B son inhibidoras de la secreción de FSH de la hipófisis, sin alterar la liberación de la LH.

Bó et al. (2007), menciona que, el mecanismo de acción (acción sistémica o de retroalimentación negativa) de la inhibina está aceptado mientras que todavía está en discusión si la acción más importante de la inhibina es a nivel general o a nivel local (en el Ovario).

b. Estrógeno

Hafez B. (2002), afirma que se encuentran sustancias con actividad estrógena tanto en animales como en plantas. El principal estrógeno que se secreta en el ovario es el estradiol 17β aunque estrona y estriol también son secretados en concentraciones menores. La

producción de estradiol por parte del folículo es un proceso en el que intervienen tanto las células de la teca y de la granulosa, con el aporte de la LH Y la FSH en un mecanismo llamado de dos células, dos gonadotropinas. También hace mención que, cuando el folículo crece, la FSH inducirá además la síntesis de receptores para la LH en las células de la granulosa, aumentando aún más la producción de andrógenos que luego son transformados en estrógenos por parte del folículo dominante.

Además Hafez B. (2002), dice que de todos los esteroides, los estrógenos muestran las funciones fisiológicas más variadas: actúan en el sistema nervioso central para inducir el comportamiento del estro de la hembra. Los estrógenos actúan en el útero haciendo que aumente la masa del endometrio y miometrio. Tal aumento se debe a la hiperplasia celular y la hipertrofia. También hace que aumente la actividad y la frecuencia de las contracciones mediante la potenciación de los efectos de la oxitocina la prostaglandina $FG\alpha$. Los estrógenos estimulan el desarrollo de las características sexuales de la hembra.

Bó et al. (2007), los estrógenos ejercen efectos de retroalimentación negativa y positiva en el control de la liberación de LH y FSH, a partir del eje hipotálamo hipofisiario. El efecto de retroalimentación positiva está íntimamente correlacionado con los niveles de progesterona circulante. Durante la fase Luteal, es decir cuando tenemos un cuerpo lúteo funcional y altos niveles de progesterona circulante, el efecto del estrógeno sobre la gonadotropinas es negativo, en cambio en la fase folicular (Luego de la luteólisis y cuando nos aproximamos al celo), al no haber concentraciones altas de progesterona en sangre el estrógeno induce la liberación de la GnRH (pico preovulatorio de LH y FSH).

c. Progestágenos

Hafez B. (2002) menciona que la progesterona es el progestágeno que se presenta en mayor cantidad en forma natural, y es secretada por células del cuerpo lúteo, la placenta y las glándulas adrenales. También menciona que, la función de la progesterona es preparar al útero para la implantación y mantenimiento de la preñez, mediante el aumento de las glándulas secretoras del endometrio y la inhibición de su motilidad. Actúa en forma sinérgica con los estrógenos para inducir el comportamiento del estro en la oveja y de la vaca. Hace que se forme el tejido secretor (alvéolo) de la glándula mamaria. Concentraciones elevadas inhiben

el estro y el pico ovulatorio de LH y afectará la frecuencia de los pulsos de LH, lo que hace evidente la importancia de esta hormona en la regulación del ciclo estral.

2.4.3.4. Dinámica Folicular

Las características del desarrollo folicular en los ciclos estrales son de 2 y 3 ondas. Una onda de crecimiento folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos individualmente identificables a partir de un diámetro de 4 mm, que ocurre al mismo tiempo en los dos ovarios. Durante aproximadamente 2 o 3 días todos los folículos crecen y uno de ellos es seleccionado, continua creciendo y se convierte en un folículo dominante, mientras que el resto de los folículos, llamados subordinados, se vuelven atrésicos y regresan (Bó et al. 2005).

2.4.4. Técnicas de colección de embriones

2.4.4.1. Recuperación por gravedad con circuito cerrado

Se usa dos catéteres de dos vías generalmente de 18 y 20G (French). Se coloca aproximadamente 1 litro de medio de lavado en un frasco que se une al Foley a través de un tubo de 50 cm de largo. La entre el Foley y el tubo se realiza a través de un colector en forma de T. El extremo libre de la T se une al tubo de salida que va a desembocar en el frasco de colección (Bo & Humberto, 2007)

Para tener una idea del tamaño del cuerno una vez llenado se dice que el cuerno de una vaquillona se distiende a un tamaño aproximado de una preñez de 35 días y el cuerno de una vaca se distiende a un tamaño de una preñez de 45 días. Una vez que no entra más medio de lavado al cuerno se cierra el tubo de entrada y se masajea de manera que el medio lave todo el cuerno. Luego se abre el tubo de salida y se colecta el medio por gravedad en un frasco estéril de vidrio. Si aún quedara medio de lavado en el cuerno éste debe masajearse suavemente para facilitar su salida (Bo & Humberto, 2007)

Una vez que se recupera la primera entrada de medio de lavado se repite el proceso hasta que se haya utilizado 500 a 800 ml de medio. El útero se va expandiendo con cada lavado cada vez más y más (especialmente en vacas multíparas) lo que permite “soltar” los embriones

que se encuentran en los pliegues de la mucosa. La temperatura del medio no es crítica pero el shocks térmico debe evitarse (Bo & Humberto, 2007).

Cuando termina la colección; el balón del catéter es desinflado y el catéter retirado. La colección del otro cuerno sigue la misma modalidad. Algunos autores recomiendan no sacar completamente el catéter y colocar el estilete mientras la punta del catéter está en el cuerpo del útero. Debe tenerse mucho cuidado en que la punta del estilete no pase a través de uno de los orificios del catéter ya que esto produciría, sin duda, una ruptura del cuerno (Bo & Humberto, 2007).

Es difícil explicar la manipulación necesaria que se debe realizar para coleccionar casi todos los embriones del útero, pero la experiencia va enseñando “cuanto” es necesario. En la medida en que se vaya adquiriendo mayor conocimiento, el porcentaje de embriones será mayor. Es importante para el técnico que recién comienza mantener los lavado de los cuernos en forma separada, así podrá determinar en cuál de estos aparece los embriones (Bo & Humberto, 2007).

2.4.4.2. Recuperación por aspiración interrumpida

Esta modalidad es una modificación de la anterior descrita, se diferencia fundamentalmente en la cantidad de medio de lavado utilizado en la colección de cada cuerno. Es muy simple y rápida de realizar una vez que se adquiere experiencia. Cuando el catéter está ubicado en el cuerno, el medio de colección es introducido por una jeringa (25-35ml) que se adosa al catéter. Se debe estar seguro que el medio usado alcance todas las áreas del endometrio. Luego el medio es aspirado con la misma jeringa y depositado en frascos de 500ml, o directamente en placas Petri. Normalmente comenzamos los dos primeros lavado con 25ml de medio y a medida que el cuerno se va distendiendo aumentamos paulatinamente hasta 35 ml (Bo & Humberto, 2007).

El 90% de los embriones serán recuperados en las 4 primeras jeringas. Se utilizan 8 jeringas por cuerno (250ml). Nosotros sugerimos la introducción rápida del medio con la jeringa, pero es importante no hacer excesiva presión, ya que se puede desgarrar el endometrio con la consecuente pérdida del medio y embriones al ligamento ancho. Tanto poca como alta presión no son adecuadas. El cuerno debe mantenerse lo más derecho posible para permitir que el

medio fluya con facilidad. Una distensión moderada del cuerno es necesaria para “despegar” los embriones de los pliegues del endometrio (Bo & Humberto, 2007).

Las principales ventajas del método de recuperación por gravedad radican en la escasa posibilidad de contaminación de los embriones por que se recuperan en un sistema que es cerrado y que el operador no necesita de un ayudante que le esté alcanzando nada ya que él mismo puede realizar la apertura y cerrado de las vías del circuito. El lavado por jeringa en cambio ofrece la ventaja de usar menos equipamiento y menos medio de lavado (Bo & Humberto, 2007).

2.4.5. Medios de colección y mantenimiento

Un medio de cultivo de embriones ideal será aquel que se asemeje física y químicamente al medio en que se encontraban los embriones al momento de ser colectados (Morales, Vargas, Salazar, & Mancheno, 2019).

Los embriones mamíferos están altamente adaptados al medio uterino de la madre por lo que se hace imprescindible mantenerlos en condiciones óptimas. El pH debería mantenerse entre $7,4 \pm 0,5$, la osmolaridad (concentración de sales) en 285 – 300 miliosmoles (Martínez, Mejía Villanueva, Zarco Quintero, Mastache Lagunas, & Reyna Santamaría q, 2017).

Existe una gran variedad de medios de cultivo pero, el más popular actualmente es el Dulbecco's Buffer Salino (PBS). Debido a que tiene fosfato como Buffer su pH cambia en forma mínima a la atmosfera. Otros medios son el TCM – 199, HMS F -10, MEM, etc., Todos tienen el inconveniente que su pH cambia fácilmente al ser expuesto a la atmosfera ya que su Buffer es el bicarbonato, por lo que deben mantenerse equilibrados en $5 \pm 0,5\%$ CO_2 y 95% de aire. (Morales, Vargas, Salazar, & Mancheno, 2019).

2.4.6. Clasificación de los embriones

2.4.6.1. Búsqueda y manejo de los embriones

Los embriones se buscan bajo la lupa con una magnificación de 10X o 15X. El medio de colección se deja sedimentar en una probeta de 500 ml. por 20 – 30 minutos, luego de finalizada la colección. El sobrenadante se extrae por sifón hasta que el medio baje la marca

50 ml. lo que queda en la probeta se coloca dentro de placas Petri estériles y descartables (100 x 15 mm) y se busca con una magnificación de 10X. Se pasa el sobrenadante (450 ml) por un filtro de plankton de 50 μ m como paso final para recuperar cualquier ovulo que haya quedado (Bo & Humberto, 2007).

Actualmente se filtra directamente todo el medio de colección utilizando filtros descartables estériles (Vet Concepts Spring Valley, USA). Finalizado el filtrado se lava la malla del filtro con PBS utilizando una jeringa y aguja fina (22 gauge o 15:5) y el fluido es colectado en una Petri y se procede a la búsqueda de los embriones (Bo & Humberto, 2007).

Se pone una placa cuadriculada debajo de la placa de Petri para facilitar la búsqueda. En cada placa se busca dos veces más luego de encontrado el último embrión. Finalizada cada búsqueda se realiza con un movimiento rotativo con la placa para despegar algún posible embrión adherido a los bordes. A medida que se van encontrados los embriones se los va colocado en una placa Petri pequeña (35 mm de diámetro) que contiene el medio de mantenimiento (PBS + 10- 20 % FCS). Para cambiar a los embriones de placa se utiliza una micropipeta con un tip. Cuando la búsqueda se ha completado se hace una primera clasificación de los embriones/ ovocitos colectados y todos los embriones son lavados 10 veces. Luego son nuevamente evaluados y colocados en medio de mantenimiento fresco (Harasymowycz, Benítez, Morales, Paul, & Checo, 2014).

Antes de ser transferidos los embriones son nuevamente colocados en un medio fresco, si los embriones se van a conservar por más de 6 h deberían ser colocados en medios de cultivo fresco dentro de un tubo de ensayo y luego colocados en un vaso en la heladera (Bo & Humberto, 2007).

2.4.7. Manejo y selección de hembras receptoras.

2.4.7.1. Programa de nutrición.

Según Gibbons & Cueto, (2013) la alimentación de una hembra destinada a la recepción embrionaria comienza con la vaquillona en crecimiento, algunos autores citan que en la práctica de la transferencia de embriones a tiempo fijo son las hembras multíparas probadas y con gran capacidad reproductiva aquellas más adecuadas para la recepción embrionaria.

Pero aun así, para poder obtener hembras que tengan como característica ser buenas reproductoras es necesario centrarse en el manejo desde temprana edad, razón por la cual el factor de nutrición es esencial para la presentación de ciclos estrales en forma normal desde la pubertad, que también permitan la sincronización de los mismos, además de proveer a la vaca de una condición corporal óptima para la recepción embrionaria y la gestación (Aisen, 2004).

Por otro lado, Martínez Rojero, Mejía Villanueva, Zarco Quintero, Mastache Lagunas, & Reyna Santamaría, (2017) también indica que debe evitarse que las vaquillonas y las vacas se engorden demasiado, ya que esto produce trastornos en la presentación del ciclo estral o la sincronización de celos, además produce distocias en los partos, trastornos de índice metabólico y de transporte, adicionado a esto un desarrollo mamario precario. Tornándose así estas instancias como limitantes para que la hembra sea tomada en cuenta para la recepción embrionaria (Harasymowycz, Benítez, Morales, Paul, & Checo, 2014).

2.4.8. Selección de receptoras

Según Gibbons & Cueto, (2013) la receptora ideal es una vaca joven, libre de enfermedades, de probada fertilidad y habilidad materna, Además, debe tener un tamaño adecuado para no presentar problemas al parto. El método más común de selección está basado en la inspección general, examen ginecológico de las hembras y en los registros reproductivos. Aunque la raza no es un factor importante, generalmente se acepta que las vacas cruzadas tienen mayor fertilidad, se escogen aquellas cuales cumplan los siguientes requisitos:

- No presentar enfermedades hereditarias
- Tener excelente historial reproductivo y salud
- Alto valor en el mercado
- Ciclos estrales regulares
- No tener enfermedades que afecten la fertilidad
- No ser demasiado viejas.

2.4.9. Estimulación ovárica para la ovulación múltiple

La OM ha sido inducida en la especie ovina y caprina mediante la administración de 1000 a 1200 UI de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) o eCG (equine Chorionic Gonadotrophin), 48 horas antes de finalizar el tratamiento progestacional. Los tratamientos con eCG han dado resultados inferiores a los obtenidos mediante FSH, debido a que por su elevado peso molecular, tiene una vida media larga (21 horas) y provoca un crecimiento folicular disperso, induce la formación de folículos anaovulatorios, luteinización folicular prematura y reduce la fertilidad, recuperación y calidad embrionaria (Gibbons & Cueto, 2013).

El tratamiento más aceptado para provocar la OM en ovinos y caprinos es mediante la aplicación de dosis decrecientes de FSH hacia el final del tratamiento progestacional. A diferencia de la eCG, la FSH presenta una vida biológica corta (3 a 4 horas), por lo que es necesaria su administración repartida en 6-8 aplicaciones cada 12 horas. La OM se presenta alrededor de las 60 horas post retiro de la esponjas con progestágenos (PREP) (Gibbons & Cueto, 2013).

La dosis de FSH se puede expresar en miligramos Armour, que es una unidad de actividad de un test biológico equivalente a 10 a 14 μ g de hormona FSH pura. Las dosis recomendables para las cabras y las ovejas varían entre los 16 a 20 mg Armour; la respuesta ovulatoria a estas dosis está sujeta a los diferentes genotipos. El aumento de la dosis de FSH (mayor a 16-20 mg Armour) no produce un incremento de la respuesta ovulatoria. Asimismo la FSH puede expresarse en mg de NIH-FSH-P1, recomendándose dosis totales de hasta 200 mg por hembra donante. Para obtener una mejor respuesta ovulatoria se aconseja administrar LH en forma creciente hacia el final del tratamiento progestacional (Cognie y col. 1986, Baril y col. 1989). Se recomienda una relación FSH/LH de 3:1 (1er a 3er aplicación), 1:1 (4ta aplicación) y 1:2 (5ta aplicación) (Gibbons & Cueto, 2013).

El “tratamiento tradicional” que más hemos utilizado en ovinos de la raza Merino, durante la época otoñal, combina dosis decrecientes de FSH con una aplicación única de eCG hacia el final del tratamiento progestacional. Consiste en la colocación de esponjas intravaginales con progestágenos (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, Progespon®, Syntex, Argentina) durante 14 días y la administración de 200 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V®, Bioniche,

Canadá) por oveja tratada, suministrados en 6 aplicaciones en forma decreciente de la siguiente manera: 50, 50, 30, 30, 20 y 20 mg de pFSH a partir del día 12 post colocación de esponja intravaginal. La quinta aplicación se realiza en coincidencia con el retiro de la esponja intravaginal y administración de 200 UI de eCG (Novormon 5000®, Syntex, Argentina).

En la raza Merino y durante la estación reproductiva, hemos comprobado que es posible reducir la dosis total de FSH por oveja donante a 80 mg totales de NIH-FSH-P1, distribuidos en 6 aplicaciones de 18, 18, 14, 14, 8 y 8 mg, a partir del día 12 post colocación de esponja intravaginal. La quinta aplicación se realiza en coincidencia con el retiro de la esponja intravaginal y administración de 200 UI de eCG (Novormon 5000®, Syntex, Argentina) De esta manera, si bien mediante el tratamiento de baja dosis se observó una menor tasa de ovulación ($P < 0.05$), el número de embriones y la calidad embrionaria fue semejante, debido probablemente a la obtención de una mayor tasa de recuperación embrionaria y una mayor tasa de fertilización ($P > 0.05$) (Gibbons & Cueto, 2013).

La presentación del celo post tratamiento con FSH (80 mg) es variable; sin embargo es habitual observar celo en las donantes entre las 24 a 48 horas PREP. También es posible obtener mediante este tratamiento más del 80% de las ovejas donantes en celo a las 36 horas PREP. La reducción del alto costo de la FSH a casi un tercio, brinda una ventaja económica para su utilización en los programas comerciales de TE (Gibbons & Cueto, 2013).

CAPITULO III. MARCO METODOLOGICO**3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación es de tipo experimental, debido a que se evaluarán diferentes protocolos de sincronización y multiovulación, sobre el efecto en el número de cuerpos lúteos, número de embriones obtenidos y calidad embrionaria en las donadoras, y en las receptoras se medirá el porcentaje de preñez.

3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**3.2.1. Análisis estadísticos**

En el presente trabajo se utilizó estadística descriptiva para cada tratamiento y para la comparación entre tratamientos se utilizó la prueba de T de student.

Los resultados de cada objetivo fueron evaluados en el paquete estadístico INFOSTAD.

3.2.2. Variables de la investigación

- Número de cuerpos lúteos
- Número de embriones obtenidos en el lavado
- Calidad embrionaria

3.2.3. Población y muestra

El presente trabajo de investigación trabaja con la población no con la muestra.

La población establecida fue de 11 ovejas donadoras, caracterizadas bajo los siguientes parámetros

- Condición corporal mayor a 3
- Antecedentes de tener crías en cada temporada
- No tener antecedentes de problemas de fertilidad
- Características fenotípicas de tipo productiva por encima del promedio

3.3.4. Ambiente de la investigación

La presente investigación se realizó en el centro experimental de Kallutaca específicamente en el módulo de ovinos y el laboratorio de biotecnología reproductiva. El centro experimental de Kallutaca se encuentra Ubicado en la provincia Los Andes del departamento de La Paz a una distancia de 27 km de la ciudad de El Alto, geográficamente se encuentra ubicado a 16°51'92" de latitud sur y 68°30'19" de Longitud Oeste y una altitud de 3990 msnm (IGM, 2005).

3.3.5. Técnicas e instrumentos

3.3.5.1. Técnica de investigación

La técnica utilizada en nuestro trabajo en investigación es la observación, el cual está basado en observar las siguientes características

- Número de cuerpos lúteos en cada ovario
- Número de embriones recuperados
- Porcentaje de embriones transferibles en base a la clasificación de calidad y grados de desarrollo
- Porcentaje de preñez

3.3.5.2. Instrumentos

Equipos

- Camilla quirúrgica reclinable (1 Und)
- Estereoscopio (1 Unid.)
- Microscopio (1 Unid.)
- Platina térmica (1 Und)
- Plato térmico (1 Und.)
- Equipo mínimo de cirugía (Agujas Traumáticas y a traumáticas, pinza mayo, bisturí, pinzas hemostáticas, tijeras, pinzas de campo, sonda acanalada, etc.)

- Sonda Foley de 2 vías de 3cc (9 Unid.)
- Termómetros (2 Unid.)
- Bandeja porta instrumental quirúrgico (2 Unid)
- Aplicador de esponjas intravaginales.
- Jeringas de 5 y 1 ml de capacidad.
- Aguja Nº 18 y 21
- Placas petry de 4 a 6 pocillos (12 Unid)
- Placas petry medianas (12 Unid)
- Pipetas de FIV. (1 unidad por animal) para laparoscopia
- Unopett (5 Unid)
- Algodón (1 libra para la elaboración de torundas)
- Gasa (1 libra)
- Papel toalla (Paquete de 3 unidades)
- Guantes de látex (1 caja)
- Catgut crómico de 000, 00, 0 ceros (5 Unid.)
- Nylon (1 Unid.)
- Hilo de algodón reforzado (1 Unid)
- Atomizadores (1 Unid)
- Pissetas (1 Unid)
- Hojas de bisturí de acuerdo al número de mango (4 Unid)
- Hojas de afeitar para el rasurado (1 cajitas)
- Tijera de esquila.
- Baldes (2 Unid)
- Lavadores (2 Unid)
- Basurero (1 Unid)
- Bolsas para desechos

Medicamentos, medios y hormonas

- Medio para la colección de embriones (Biolife)

- Medio de mantenimiento Holding (2 sachet)
- Suero fisiológico (1 lt)
- Penicilina procainica en polvo (0,5 gr por animal)
- Violeta de genciana (5 ml por animal)
- Ciprofloxacina. (Frasco de 100 ml)
- Promazil (Acepromazina, 0.3 ml por animal)
- Lidocaína al 2% (anestésico local 6 ml por animal)
- Alcohol yodado (1 Lt)
- Alcohol de 70° (1 Lt)
- Esponjas intravaginales
- Folligón eCG (200 UI por animal)

3.3.6. Procedimiento de la investigación

3.3.6.1. Inducción de la ovulación en las hembras donadoras y sincronización del estro en la donante.

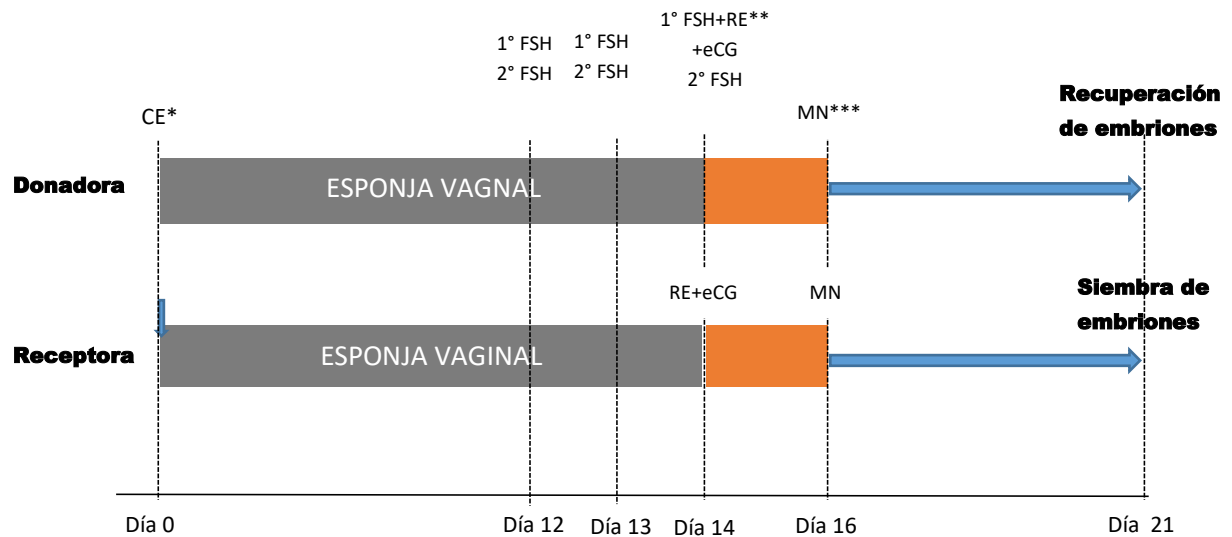
La sincronización de los estros de las receptoras mediante tratamiento progestacional se realizó en forma conjunta con las hembras donantes. En general se dispuso de 3 receptoras por cada oveja donante.

Los protocolos de sincronización fueron caracterizados de acuerdo a cada objetivo planteado.

El objetivo 1 está basado en la aplicación de una dosis alta y 6 dosis de pFSH en forma decreciente, el cual se presenta en la figura 1.

Figura 1

Esquema del diseño experimental en base al protocolo con la aplicación de 6 dosis decrecientes de FSH para la estimulación multiovulatoria de la donadora y el protocolo para la receptora



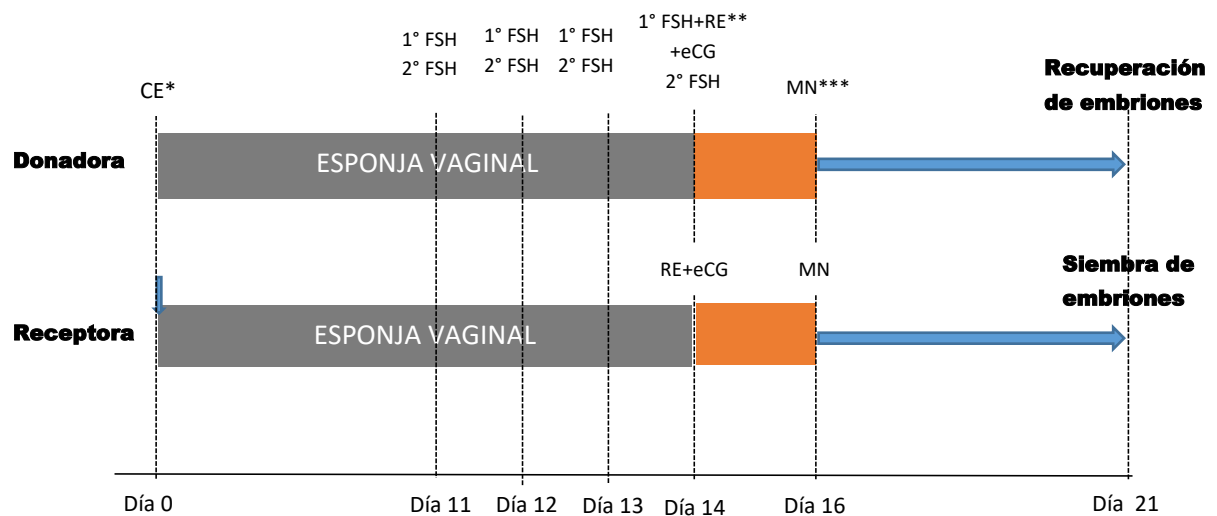
Nota. * Colocación de la esponja
 ** Retiro de la esponja
 *** Monta Natural

Fuente: Elaboración propia

El objetivo 2 está basado en la aplicación una dosis baja y en 6 dosis de pFSH en forma decreciente, el cual se presenta en la figura 2.

Figura 2

Esquema del diseño experimental en base al protocolo con la aplicación de 8 dosis decrecientes de FSH para la estimulación multiovulatoria de la donadora y el protocolo para la receptora



Nota. * Colocación de la esponja

** Retiro de la esponja

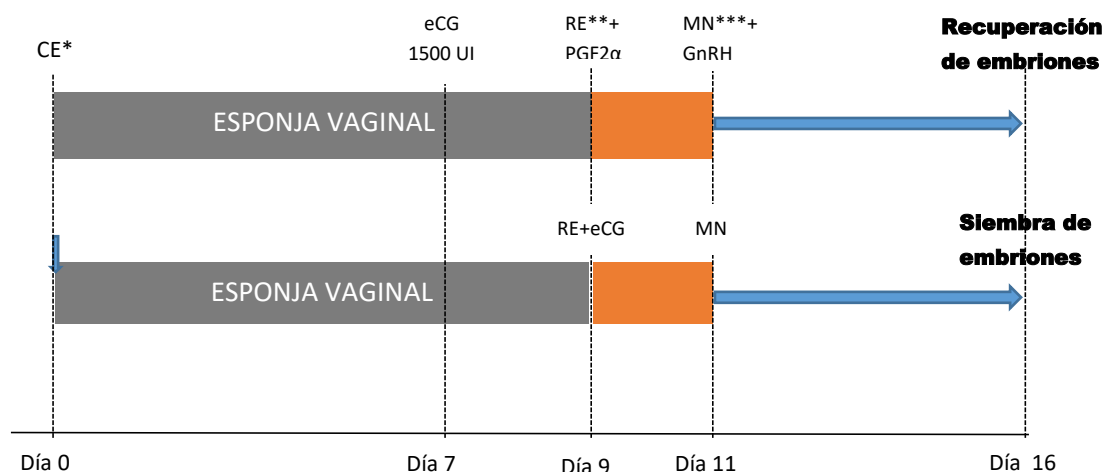
*** Monta Natural

Fuente: Elaboración propia

El objetivo 3 está basado en la aplicación de 1 sola dosis de eCG de 1200 UI, de acuerdo al siguiente esquema presentada en la figura 3.

Figura 3

Esquema del diseño experimental en base al protocolo de aplicación de una sola dosis de eCG para la estimulación multiovulatoria de la donadora y el protocolo para la receptora



Nota. * Colocación de la esponja

** Retiro de la esponja

*** Monta Natural a las 12 hrs en base a la detección de celo

Fuente: Elaboración propia

Los 3 protocolos describen dentro sus figuras la sincronización de las receptoras, pero dentro el trabajo no se trabajó con receptoras por falta de animales con las condiciones requeridas.

3.3.6.2. Fecundación de la hembra donante

La fecundación en las hembras donantes se realizó mediante servicio natural a corral. El servicio a corral se realizara cada 12 horas, desde el comienzo del celo y hasta su finalización.

3.3.6.3. Colecta de embriones

La metodología empleada para la obtención de embriones consiste en inyectar un medio líquido para producir una corriente de arrastre ("lavado o flushing") a través de los cuernos uterinos. Se utilizara un medio comercial en base a PBS (Solución Buffer Fosfato), al que se le adicionara un 10% de suero adulto bovino, ovino o caprino inactivado. Para la obtención de suero, se sangrará un animal en forma aséptica con material esterilizado. El *suero* se centrifugara a 2000 g durante 15 minutos. Se tomara el sobrenadante y se realiza una segunda centrifugación. Se filtra por membrana de 0.22 μ m. La inactivación de la proteína complemento se realizara en baño de agua a 56 °C durante 30 minutos. El suero filtrado inactivado se puede conservar durante un año a -20 °C.

La colecta embrionaria se realizara en los días 7^{mo} u 8^{vo} PREP. Las técnicas para la colecta de embriones se llevarán a cabo bajo anestesia general. Los animales no recibirán alimento ni agua en las 24 horas previas a la operación. Se utilizara un tranquilizante intramuscular (2 mg/10 kg, Xilazina 2%) y un anestésico endovenoso (50 mg/10 kg, Thiopental sódico). También si es necesario se realizara una combinación de Xilazina (2 mg/10 kg, Xilazina 2%) y Ketamina (1.1 mg/10 kg, Clorhidrato de Ketamina), ambos se administraran en forma intramuscular (Xilazina: 0.2 ml, Ketamina: 3 ml, respectivamente). Asimismo se aplicara un anestésico local en el área quirúrgica (1 ml, Lidocaína 2%).

3.3.6.4. Recolección de embriones (Técnica quirúrgica)

La hembra se ubicara en un plano inclinado en una camilla (cabeza hacia abajo). Se rasurara y se desinfectara el campo operatorio. Se realizara una laparotomía media de 5 a 7 cm, y a 3 cm por delante de la ubre.

Antes de comenzar con la recuperación embrionaria, se realizara la determinación de la respuesta ovulatoria (recuento del número de cuerpos lúteos, CL), mediante exteriorización de los ovarios o por observación ecográfica. En base al número de estructuras colectadas se determina el porcentaje de recuperación embrionaria.

La recuperación embrionaria consiste en la colocación de una sonda (K33) que en su extremo dispone de una aguja (50/20) con punta no traumática y dos perforaciones laterales y una

central. Se realiza una punción en la unión útero tubárica y se enhebra la sonda en el interior de la luz del cuerno uterino (1 cm), fijando la misma por medio de un clamp vascular o ligadura. Aproximadamente a un par de cm de la bifurcación de los cuernos uterinos, se realiza una segunda punción, para la inyección de 20 ml de PBS a 38 °C. De esta manera se produce una corriente de arrastre que fluye hacia la unión útero tubárica, donde está ubicada la sonda, y el medio de colecta es recuperado en un Erlenmeyer estéril previamente entibiado. Se procede de igual manera con el otro cuerno uterino.

Finalizada la recuperación embrionaria, se realizara la sutura de los planos quirúrgicos y se administrará antibióticos.

3.3.6.5. Búsqueda de embriones

El medio de lavado recolectado es vertido en una placa de búsqueda de embriones. La búsqueda se realizará bajo lupa con platina térmica a 38 °C. Se recomienda efectuar siempre una segunda lectura de la placa. A medida que se identifican los embriones, los mismos son aspirados mediante micropipeta y colocados en una caja de Petri con medio de conservación o Holding, a resguardo de la luz y a temperatura de laboratorio. Una vez finalizada la búsqueda, se procede a la clasificación de los embriones. Se debe trabajar en condiciones estrictas de esterilidad.

3.3.6.6. Clasificación de los embriones

La clasificación de los embriones se realizara en base a sus aspectos morfológicos y con 10 a 40 aumentos. Una micropipeta o una fina pipeta de vidrio permitirán mover los embriones, para poder observarlos desde distintos ángulos. Se debe observar la integridad de la membrana pelúcida y su esfericidad. El embrión debe tener un desarrollo acorde con el día de colecta; se tolera hasta un máximo de 24 horas de retraso. Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración. El grado de calidad es una estimación de la predicción de sobrevivencia embrionaria. Uno de los sistemas de clasificación consiste en cuatro categorías (grados 1, 2, 3 y degenerados), los cuales se describen a continuación

Grado 1: Indica que el embrión es casi perfecto con más de 98% de la masa celular activa y saludable.

Grado 2: Indica que el 70 a 98% de la masa celular es activa y saludable; pueden presentarse algunas blastómeras extruidas.

Grado 3: Indica que los embriones son de baja calidad, presentan menos del 70% de la masa celular activa y saludable; varios blastómeros se presentan extruidas. Los embriones degenerados no presentan signos de masa celular activa y la mayoría de las membranas presentan ruptura.

3.3.6.7. Siembra de los embriones

- Los animales fueron mantenidos en ayunas 18 a 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. (Laparotomía).
- Realizar el rasurado de la zona operatoria 3 a 4 cm paralelo a la línea alba por delante de la ubre.
- Antes de ingresar a la sala de operaciones administrar a los animales como tranquilizante 0.3 ml de Xilacina.
- Colocar a la hembra tranquilizada en la camilla, teniendo especial cuidado en la sujeción de los miembros del animal.
- Desinfección de la zona operatoria.
- Realizar una laparotomía media de 5 a 7 cm. Y a 2 cm delante de la ubre
- Ubicación de los ovarios y exteriorización de los mismos, para determinar la respuesta ovulatoria identificando el cuerpo lúteo.
- Exteriorización de los cuernos uterinos y siembra del embrión.
- Finalizada la siembra, realizar la sutura de los planos quirúrgicos, dependiendo de la complicación de la operación administrar antibióticos.

CAPITULO IV RESULTADOS

4.1. RESPUESTA MULTIOVULATORIA CON FOLLTROPIN – V EN DOSIS ALTA

En la tabla 1 se expone los resultados de las ovejas que fueron tratadas con Folltropin – V como estimulante multiovulatorio, con una dosis de 133, mg/oveja.

Se trabajó con un total de 3 ovejas de las cuales el 100% respondieron al tratamiento.

Tabla 1

Características de respuesta multiovulatoria, en hembras donadoras sincronizadas y estimuladas con Folltropin – V, con una dosis de 133 mg/oveja

Tratamiento	Variable	N	Media	Mín	Máx
Folltropin -V 1	No. Cuerpos				
	lúteos	3	9±2,65	7	12
	No. de embriones	3	6±1,73	5	8
	Grado 1	3	2,33±1,53	1	4
	Grado 2	3	2±1	1	3
	Grado 3	3	1	1	1
	Grado 4	3	0,67±1,15	0	2

Fuente: Elaboración propia

El promedio de cuerpos lúteos encontrados en el tratamiento con dosis alta de pFSH (Folltropin – V) y en forma decreciente fue 9±2,65 por oveja, teniendo como mínimo 7 y máximo 12. La cantidad de embriones obtenidos con el mismo tratamiento fue de 6±1,73 por oveja, obteniendo como máximo 8 y como mínimo 5 embriones.

Harasymowycz, Benítez, Morales, Paul, & Checo (2014), realizaron un estudio similar al nuestro, divididos en 2 lotes. El lote 1 (DEC) recibió una dosis total de 240mg de FSHp (Laboratorio Syntex), en cambio el lote 2 recibió dosis constantes de 30mg de la misma hormona cada 12hs durante 4 días; en la dosis decrecientes, cada 12hs, durante 4 días. En el lote 1 (DEC) se contabilizaron un total de 92 cuerpos lúteos, de los cuales 50

correspondieron al ovario izquierdo y 42 al derecho; en el lote 2 (CON) fueron observados un total de 61 cuerpos lúteos, de los cuales 38 correspondieron al ovario izquierdo y 23 al ovario derecho. En este estudio, en el lote 1 (DEC) se observaron en promedio $18,4 \pm 1,6$ CL por animal, con un rango de 17 a 21, mientras que en el lote 2 (CON) se encontró un promedio de $12,2 \pm 3,4$ CL por animal, con un rango de 8 a 17 CL. La diferencia en la cantidad de cuerpos lúteos contabilizados en ambos lotes resultó estadísticamente significativa a favor del tratamiento de superovulación a dosis decrecientes ($p \leq 0,05$). Estos resultados podrían deberse al hecho de que en el protocolo de dosis decrecientes la administración de la FSH se asemeja más al patrón de secreción hipofisaria de esta hormona.

De acuerdo a la clasificación establecida por la IETS, $2,33 \pm 1,53$ embriones obtenidos fueron clasificados como grado 1 o excelentes y 2 ± 1 como grado 2 o buenos; siendo ambos grados transferibles, pero solamente los de grado 1 congelable.

Simonetti L. (2008) realizó un trabajo de investigación donde comparó 3 tratamientos de superestimulación siendo las tasas de fertilización difirieron estadísticamente ($P < 0,05$) entre los tres tratamientos (A2: 54,2%; B2: 81,6% y C2: 93,9%), y las ovejas estimuladas mediante el protocolo convencional de dosis múltiples tendieron ($P = 0,07$) a producir más embriones fertilizados ($7,3 \pm 1,0$) que aquellas pertenecientes a los otros grupos ($4,3 \pm 1,1$ y $4,8 \pm 0,8$ embriones para A2 y B2), el protocolo convencional es el mismo utilizado en el trabajo de investigación, pero con la diferencia que nuestro trabajo obtuvo un embrión menos al obtenido por Simonetti L. (2008).

4.2. RESPUESTA MULTIOVULATORIA CON FOLLTROPIN – V EN DOSIS BAJA

En la tabla 2 se muestra los resultados de las ovejas donadoras que fueron tratadas con Folltropin – V como estimulante multiovulatorio, con una dosis de 100 mg/oveja. El número de ovejas que respondieron al tratamiento hormonal fue de 1 de 4, llegando solamente al 25% de respuesta folicular.

Tabla 2

Características de respuesta multiovulatoria, en hembras donadoras sincronizadas y estimuladas con Folltropin – V, con una dosis de 100 mg/oveja

Tratamiento	Variable	N	Media	Mín	Máx
Folltropin – V 2	No. Cuerpos				
	lúteos	1	4	4	4
	No. de embriones	1	2	2	2
	Grado 1	1	0	0	0
	Grado 2	1	0	0	0
	Grado 3	1	0	0	0
	Grado 4	1	2	2	2

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 2 se observa el promedio de cuerpos lúteos encontrados en el tratamiento con dosis baja de pFSH (Folltropin – V) y en forma decreciente fue 4 en una sola oveja, las demás no respondieron al tratamiento y la cantidad de embriones obtenidos en la misma oveja fue de 2.

Cueto M, Gibbons A y Escobar L. (2010) en un trabajo realizado con una dosis de 80 mg de pFSH obtuvieron un total de $13,8 \pm 2,2$ cuerpos lúteos y $8,3 \pm 1,4$ de embriones, siendo estos resultados superior a los obtenidos en el experimento realizado por nosotros.

Los resultados obtenidos y la mala respuesta de las ovejas donadora se podría indicar que fueron debido al factor nutricional y estado fisiológico de las hembras, ya que estas eran hembras en estado de lactancia. Si bien fueron destetadas y alimentadas con una ración extra,

esto para aminorar el efecto de la cría y el estado corporal, se puede concluir que las alternativas planteadas no fueron adecuadas para las donadoras.

4.3. RESPUESTA MULTIOVULATORIA CON ECG

En la tabla 3 se observa la respuesta multiovulatoria de 4 ovejas tratadas con una dosis de 1200 UI de eCG, donde solamente 3 de 4 respondieron al tratamiento.

Tabla 3.

Características de respuesta multiovulatoria, en hembras donadoras sincronizadas y estimuladas con eCG (1200 UI)

Tratamiento	Variable	N	Media	Mín	Máx
eCG	No. Cuerpos				
	lúteos	3	2,67±0,58	2	3
	No. de embriones	3	1,67±0,58	1	2
	Grado 1	3	0	0	0
	Grado 2	3	0,67±0,58	0	1
	Grado 3	3	0	0	0
	Grado 4	3	0,67±0,58	0	1

Fuente: Elaboración propia

La tabla 3 nos muestra como promedio la obtención de 2,67±0,58 cuerpos lúteos y 1,67±0,58 de embriones obtenidos por oveja superestimulada. De acuerdo a la clasificación determinada por la IEST, el 0,67±0,58 de los embriones obtenidos fueron de calidad o grado 2, esto significa que puede ser transferidos pero no congelados.

Morales, Vargas, Salazar, & Mancheno (2019), en un estudio realizado con diferentes dosis de eCG obtuvieron los siguientes resultados: en una dosis con 1000 UI el 87,5% de los animales respondió con un promedio 5,40 ±3,02 de presencia de cuerpo lúteo y en una dosis mayor de 1500 UI de eCG respondieron el 100% de los animales tratados, con un promedio 9,8±5,20 Cuerpos Lúteos, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa (p

>0,05) entre el promedio de CL de las diferentes dosis empleadas. Los resultados obtenidos fueron mayor a los encontrados en el experimento realizado por nosotros

4.4. TASA DE RECUPERACIÓN

La tasa de recuperación se debe a la

Tabla 4

Tasa de recuperación de embriones por tratamiento

Tratamientos	Número de ovejas	Respuesta al tratamiento (%)	No. Cuerpos lúteos	No. de embriones	Tasa de recuperación (%)
1	3	100	9	6	66,6
2	4	25	4	2	50
3	4	75	2,67	1,67	62,5

Fuente: Elaboración propia

La tabla 4 nos muestra que el porcentaje de recuperación del proceso de lavado de embriones fue del 66,6% en el tratamiento 1 significativamente mayor ($P < 0,05$) a los otros tratamientos.

Téllez Rubí, S., Lopez Aguilar, A., Juárez Cruz, J., & Rangel Santos, R. (2011) en un estudio realizado de superovulación con ovejas de las razas Rideau, R y Suffolk, obtuvieron los siguientes resultados: la tasa de recuperación para la raza Suffolk fue de 47.36 ± 12.43 y para la raza Rideau de 14.29 ± 14.29 , estos datos se relacionaron a la reducida cantidad de superestimulaciones.

4.5. TASA DE EMBRIONES TRASFERIBLES

Tabla 5

Tasa de embriones transferibles y no transferibles, de acuerdo a cada tratamiento

Tratamientos	Número de ovejas	Embriones transferibles	Embriones no transferibles	Tasa de embriones viables
1	3	4,34	1,67	72,2
2	4	0	2	0
3	4	0,67	0,67	50

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 5 se puede observar que la tasa de embriones viables y transferibles fue del 72,2 % en el tratamiento 1, siendo este estadísticamente superior ($P < 0,05$) a los demás tratamientos.

Martínez, Mejía Villanueva, Zarco Quintero, Mastache Lagunas , & Reyna Santamaría q, (2017), el 100% de las ovejas donadoras presentaron estrus, pero la tasa de superovulación, el número de cuerpos lúteos y el número de embriones transferibles recolectados en respuesta al protocolo de superovulación al que fueron sometidas, fue de 50.0%, 4.3 ± 5.2 , 2.2 ± 2.5 y 50.0%, respectivamente. La tasa de preñez registrada en las hembras receptoras fue de 50%.

Molina G. (2012), obtuvo un total de 359 estructuras embrionarias de 24 donantes, de estos 323 eran transferibles, para un promedio de 13 embriones transferibles por donante, con un máximo de 25 embriones por oveja y un mínimo de 0. Solo tres donantes dieron cantidades ≤ 3 embriones transferibles, lo cual concuerda con lo reportado en literatura de que un 20% de las hembras tratadas hormonalmente no responden (Gibbons & Cueto, 2010).

CAPITULO V CONCLUSIONES

- En la evaluación de multiovlación realizada con pFSH (Folltropin – V) en dosis alta y en aplicación decreciente, se puede indicar que este fue uno de los mejores protocolos de multiovlación ovárica ya que los resultados nos dieron un mayor número de cuerpos lúteos y embriones en comparación de los otros protocolos analizados; este resultado se puede indicar que fue favorable debido a que las ovejas recibieron una mayor concentración de pFSH, el cual tiene un mejor resultado en hembras con condición corporal de 2,5.
- El protocolo 2 en el cual también se utilizó pFSH (Folltropin – V) pero en dosis baja, se observó que los resultados no fueron favorables, ya que 3 de 4 ovejas no respondieron al tratamiento, la dosis no llegó a inducir multiovlación ovárica, estos resultados se deben al factor nutricional y fisiológico, ya que las ovejas utilizadas eran hembras recién destetadas, efectos que influyeron en el resultado esperado.
- En la aplicación del protocolo 3 donde se utilizó 1200 UI de eCG como factor multiovlación ovárico se obtuvo una respuesta media, ya que las ovejas no respondieron como lo estimado, solamente llegaron a producir, 2,6 embriones de promedio por oveja, esto se debió a la dosis utilizada ya que en comparación con otros trabajos de investigación el resultado fue mayor en dosis de 1500 UI.

CAPITULO VI. RECOMENDACIONES**6.2. En el ámbito científico**

- Si bien se encontró un protocolo aceptable, por la respuesta observada, se debe seguir probando nuevos protocolos, ya sea desde el punto de probar la dosis, la forma de aplicación, la época del año, el estado nutricional e incluso el número de partos.
- También se debe trabajar utilizando la eCG como super estimulante ovárico, ya sea puro o combinado con pFHS, esto debido al factor económico ya que el costo de las hormonas que contienen pFHS son de alto costo y no muy accesibles en el mercado local.
- Por ultimo también se debe realizar trabajos en receptoras, desde el punto nutricional hasta la aplicación de un protocolo que tenga una mejor preparación del cuerpo lúteo y por ende un mejor porcentaje de preñez.

6.3. En lo Institucional

La estandarización de protocolos de multiovulación en ovinos permite a la institución iniciar esta biotecnología reproductiva en el Centro Experimental Pecuario de Kallutaca, como también difundir el material genético a las diferentes comunidades del departamento de La Paz, es por tal razón que se recomienda los siguientes aspectos:

- Se tiene que establecer un calendario de manejo para establecer la época reproductiva, ya que esto nos permitirá preparar con anterioridad todo lo referente a la biotecnología reproductiva.
- Se debe implementar y equipar el laboratorio de biotecnología reproductiva, para que estos trabajos de investigación se realicen en forma continua.

BIBLIOGRAFIA

- Aisen, E. (2004). *Reproducción ovina y caprina*. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica S.A.
- Alencastre Delgado, R., & Gómez Urviola, N. (2005). Comportamiento reproductivo del ovino criollo en el altiplano peruano. *Archivos de zootecnia*, 541 - 544.
- Bo, G., & Humberto, T. (2007). *Transferencia de embriones y nuevas tecnologías*. Cordoba - Argentina: IRAC.
- Cueto M, Gibbons A, Escobar L. (2010). Segundas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal-INITRA. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. Buenos Aires, Argentina. CD.
- Galina , C., & Valencia , J. (2008). *Reproducción de animales domésticos*. México: Limusa, S.A.
- Gibbons, A., & Cueto, M. (2013). *Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos*. Bariloche, Argentina: INTA EEA.
- Hafez, B. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*. (G. Feher de la Torre, & E. Olvera Martinez, Trans.) U.S.A.: McGraw - Hill Interamericana.
- Harasymowycz, J., Benítez, M., Morales, C., Paul, A., & Checo, F. (2014). Respuesta ovarica a tratamientos superovulatorios con dosis constante y decreciente de FSHp evaluada por laparoscopia en ovejas cruza Texel. *Compend. cienc. vet.*, 19 -23.
- Martínez Rojero, R., Mejía Villanueva, O., Zarco Quintero, L., Mastache Lagunas, A., & Reyna Santamaría, L. (2017). Evaluación de un protocolo de superovulación para transferencia de embriones en ovejas Criollas de la Montaña de Guerrero. *revistasabanico*, 30 -36. doi:<http://dx.doi.org/10.21929/abavet2017.73>.
- Molina G. (2012). Técnicas Reproductivas en Ovinos: Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones en la Empresa OVITEC, Punta Arenas, Chile (Tesis de grado). Universidad Nacional Facultad Ciencias de la Salud Escuela de Medicina Veterinaria. Punta Arenas, Chile.
- Morales, M., Vargas, J., Salazar, R., & Mancheno, R. (2019). Protocolo de superestimulación utilizando diferentes dosis de Gonadotropina Corionica Equina (eCG) en la producción de embriones ovinos. *Revista Científica Ecuatoriana*, 59 - 64. doi:<https://doi.org/10.36331/revista.v6i1.66>
- Simonetti L. (2008). "Simplificación de los métodos de Superovulación en ovejas de la raza Corriedale", Valencia España (Tesis de doctorado). Universidad Politecnica de Valencia, España.

Téllez Rubí, S., Lopez Aguilar, A., Juárez Cruz, J., & Rangel Santos, R. (2011). Transferencia de embriones en ovejas Suffolk y Rideau en clima templado. *Universidad Autónoma de Chapingo*.

ANEXOS

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
Anexo A Datos estadísticos

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Medidas resumen

TRATAMIENTO	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
1	No. Cuerpos lúteos	3	9,00	2,65	7,00	12,00
1	No. de embriones	3	6,00	1,73	5,00	8,00
1	Grado 1	3	2,33	1,53	1,00	4,00
1	Grado 2	3	2,00	1,00	1,00	3,00
1	Grado 3	3	1,00	0,00	1,00	1,00
1	Grado 4	3	0,67	1,15	0,00	2,00
2	No. Cuerpos lúteos	1	4,00	0,00	4,00	4,00
2	No. de embriones	1	2,00	0,00	2,00	2,00
2	Grado 1	1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	Grado 2	1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	Grado 3	1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	Grado 4	1	2,00	0,00	2,00	2,00
3	No. Cuerpos lúteos	3	2,67	0,58	2,00	3,00
3	No. de embriones	3	1,67	0,58	1,00	2,00
3	Grado 1	3	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Grado 2	3	0,67	0,58	0,00	1,00
3	Grado 3	3	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Grado 4	3	0,67	0,58	0,00	1,00

Prueba T para muestras Independientes

Variable: No. Cuerpos luteos - Clasific: TRATAMIENTO - prueba:Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	1	3
n	3	3
Media	9,00	2,67
Media (1) -Media (2)	6,33	
LI (95)	1,99	
LS (95)	10,67	
pHomVar	0,0909	
T	4,05	
p-valor	0,0155	

Variable:No. de embriones - Clasific:TRATAMIENTO - prueba:Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	1	3
n	3	3
Media	6,00	1,67
Media (1) -Media (2)	4,33	
LI (95)	1,41	
LS (95)	7,26	
pHomVar	0,2000	
T	4,11	
p-valor	0,0147	

Anexo B Registro fotográfico

“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN OVINOS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL DE KALLUTACA”



Foto 1. Hembras preparadas para la multiovulación



“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE
MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE
EMBRIONES EN OVINOS EN EL CENTRO
EXPERIMENTAL DE KALLUTACA”

Foto 2 mezclado del alimento para inicio del flushing en donadoras y receptoras.



Foto 3. Alimentación de las hembras donadoras y receptoras.



“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE
MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE
EMBRIONES EN OVINOS EN EL CENTRO
EXPERIMENTAL DE KALLUTACA”

Foto 4 Colocación de esponjas intravaginales para la sincronización de ovejas donadoras y receptoras



Foto 5. Oveja con esponja intravaginal



Foto 6. Preparación de la hembra para la Laparotomía



Foto 7. Evaluación de la respuesta multiovulatoria en cada ovario



Foto 8. Proceso del lavado de embriones



Foto 9. Selección y evaluación de embriones

“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN OVINOS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL DE KALLUTACA”

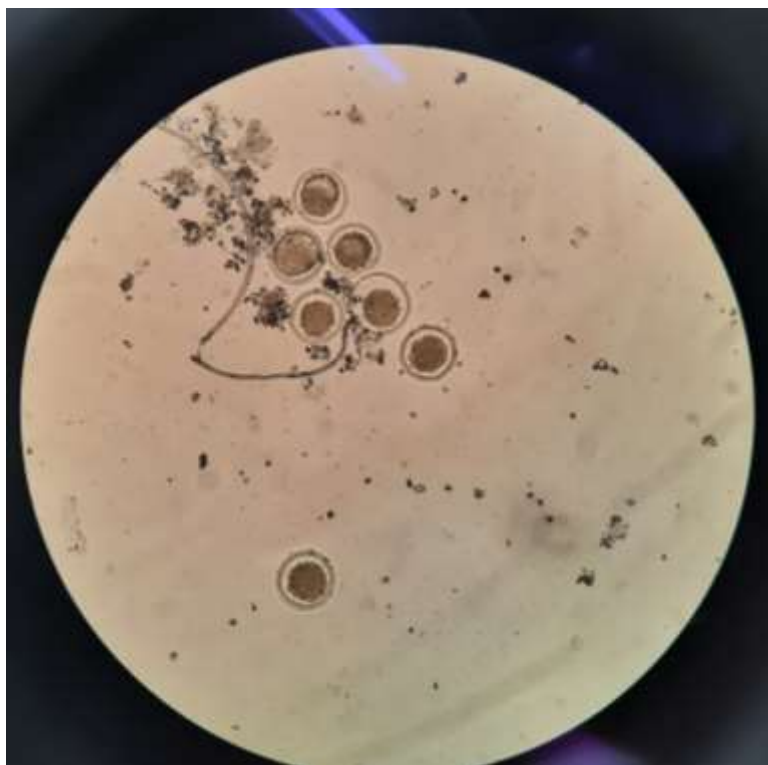


Foto 10. Clasificación de los embriones

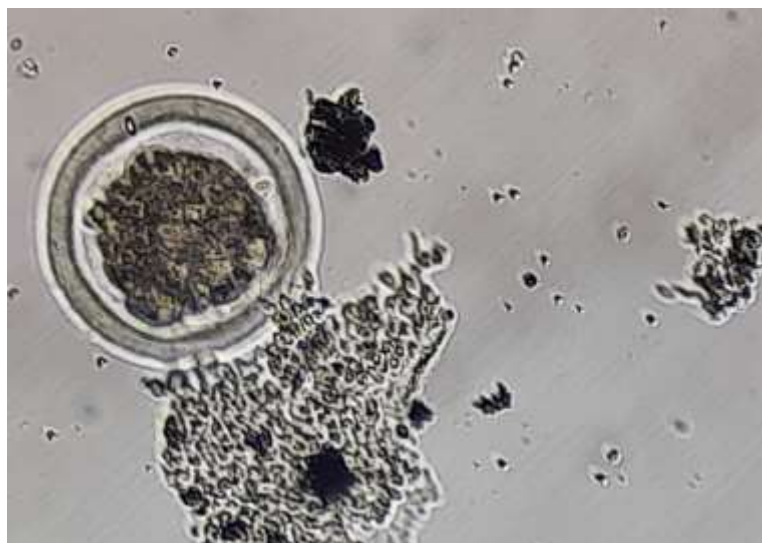


Foto 11. Estado de Mórula, calidad 1