

**Manual de procedimientos para el laboratorio  
de transferencia de embriones en bovinos de  
la empresa Genetic Resources International  
(GRI) and Sexing Technologies**

**Julio César Orellana Banegas  
Ever Manuel Peralta Peralta**

**ZAMORANO, HONDURAS**  
Diciembre, 2007

**ZAMORANO**  
**Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria**

**Manual de procedimientos para el laboratorio  
de transferencia de embriones en bovinos de  
la empresa Genetic Resources International  
(GRI) and Sexing Technologies**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingenieros Agrónomos en el grado  
Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Julio César Orellana Banegas**  
**Ever Manuel Peralta Peralta**

**Zamorano, Honduras**  
Diciembre, 2007

Los autores conceden a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

Julio César Orellana Banegas

---

Ever Manuel Peralta Peralta

**Honduras**  
Diciembre, 2007

**Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia  
de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources  
International (GRI) and Sexing Technologies**

Presentado por:

Julio César Orellana Banegas  
Ever Manuel Peralta Peralta

Aprobado:

---

John J. Hincapié, Ph.D.  
Asesor principal

---

Miguel Vélez, Ph.D.  
Director Carrera Ciencia y  
Producción Agropecuaria

---

Rógel Castillo, M.Sc.  
Asesor

---

Raúl Espinal, Ph.D.  
Decano Académico

---

Isidro A. Matamoros, Ph.D.  
Asesor

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

---

John J. Hincapié, Ph.D.  
Coordinador Área Temática  
Zootecnia

## **DEDICATORIA**

### **J.C.O.B.**

A Dios por cuidarme y bendecirme en todo momento.

A mis padres por el apoyo y amor brindado durante mis estudios.

A mi hermano y mis hermanas por el apoyo y confianza.

A mis amigos por la amistad y apoyo en la universidad.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **J.C.O.B.**

A Dios, todopoderoso por el amor brindado en los buenos y malos momentos.

A mi padre Julio Orellana y mi madre Orestila Banegas por la confianza, el apoyo y el sacrificio que me han dado durante mi vida.

A mi hermano Rubén Orellana por el apoyo, a mis hermanas Lourdes Orellana y Claudia Orellana por su inmenso amor.

A mi amigo y compañero Ever Peralta por darme la oportunidad de realizar la pasantía con él y por el apoyo durante la elaboración de la tesis.

Al señor Juan Moreno y las personas del laboratorio de transferencia de embriones y de toda la empresa por brindarnos la oportunidad de realizar la pasantía en especial al Dr. Alfredo Castro, Dr. Néstor Díaz, Dr. Meliton Fosado y a don Beto.

Al Dr. John Jairo Hincapié por brindarnos el apoyo necesario para elaborar la tesis.

A las personas que con su ayuda formaron parte de la elaboración de este documento en especial a Victor Valdivia.

A mis amigos Olvin Rodriguez, Mario Ordoñez, Alvaro Chávez, Pablo Villavicencio, Jorge Rojas y Diego Cevallos.

## **DEDICATORIA**

### **E.M.P.P**

A Dios padre celestial, por ser el quien haya hecho posible todos mis logros. Por ser luz y vida en mí camino. Y por todas sus bendiciones.

A mi madre Ursula del Socorro Peralta Ramírez, por que es el ser que ha moldeado mi vida y a quien le debo lo que soy. Por todos sus cuidados y consejos, y por ese amor incondicional que me ha brindado siempre.

A mi padre Escolástico del Carmen Peralta Centeno (QDP), por que durante el tiempo que compartimos, logró inculcar en mí, el espíritu de lucha y perseverancia. Y a quien heredé la nobleza de mi ser.

A mis hermanos y sobrinos por que han sido una fuente de inspiración.

A mis abuelos: Dolores Ramírez Huete (QDP), Maria Luisa Centeno (QDP) y Manuel de Jesús Peralta Reyes (QDP), por que sus recuerdos me han iluminado siempre.

A mis primos, amigos y demás familiares, por todo el apoyo que me han brindado.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **E.M.P.P.**

Agradezco a Dios por iluminarme siempre, por permitir equivocarme y corregir mis errores, por ayudarme a descubrir el verdadero valor de la vida y por que sin su aliento no hubiese podido culminar este trabajo.

Agradezco de corazón a mi madre por sus sabios consejos y regaños, por que si ellos no hubiese dado lo mejor de mi. Por haber sabido ser padre y madre en estos últimos 5 años y por llevarme siempre en sus oraciones.

Agradezco a mis hermanas Edelma, Maryuri y Yadira, por estar presentes siempre en los momentos más difíciles y orientarme hacia donde avanzar.

Agradezco de manera especial a mi hermano Mario José Peralta Peralta, por su apoyo incondicional.

Al señor Juan Moreno y su equipo del laboratorio de transferencia de embriones: Dr. Alfredo Castro, Dr. Néstor Díaz, Dr. Meliton Fosado y al tío Beto (Luís Alberto Peralta Centeno), por su enorme colaboración en la elaboración de este documento.

Al Dr. John Jairo Hincapié, por su excelente asesoramiento y sus buenas enseñanzas.

A mi colega y amigo Julio Orellana, por la amistad brindada y la enorme contribución en la elaboración de este documento.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de esta tesis.



## RESUMEN

Orellana, J; Peralta, E. 2007. Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International & Sexing Technologies. Proyecto Especial Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 42 p.

La tecnología de la reproducción animal tiene el objetivo de mejorar las especies animales para satisfacer la demanda del mercado. La Transferencia de Embriones (T.E.) surge con la medida de reproducir una mayor cantidad de animales de buena genética en un menor tiempo. Genetic Resources International & Sexing Technologies tiene la ubicación 22575 SH6 South. Navasota, Texas 77868, USA. La información necesaria para elaborar el manual de procedimientos fue recopilada de enero a abril de 2007. La recopilación de datos consistió en entrevistas al personal de trabajo y búsqueda de información, tanto en los archivos como en la literatura. Este manual tiene por objetivo normalizar las actividades que se llevan a cabo en las diferentes áreas de producción de embriones, así como también describir los procesos para que los empleados estén más familiarizados con estos y puedan realizar sus labores de manera eficiente.

**Palabras clave:** Donadoras, receptoras, sincronización, superovulación

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas .....	iii
Dedicatoria J.C.O.B.....	iv
Agradecimientos J. C.O.B.....	v
Dedicatoria E.M.P.P.....	vi
Agradecimientos E.M.P.P.....	vii
Resumen .....	viii
Contenido .....	ix
Índice de cuadros.....	xi
Índice de figuras .....	xii
Índice de anexos .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>TRACTO REPRODUCTOR DE LA VACA .....</b>	<b>4</b>
Anatomía.....	4
Sistema endocrino.....	5
<b>FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS PROGRAMAS DE T.E. ....</b>	<b>9</b>
Factor hormona .....	9
Factor nutrición .....	10
Factor raza .....	10
Factor edad .....	11
Factor clima .....	11
Factor protocolo .....	11
<b>VACAS DONADORAS.....</b>	<b>12</b>
Alojamiento.....	12
Identificación.....	12
Nutrición .....	12
Manejo.....	13

Cantidad de vacas donadoras .....	13
Protocolos de superovulación de vacas donadoras .....	13
Colecta de embriones .....	15
Materiales .....	16
<b>VACAS RECEPTORAS.....</b>	<b>19</b>
Alojamiento .....	19
Sanidad .....	19
Nutrición .....	19
Manejo.....	20
Sincronización de celo .....	20
Transferencia de embriones. ....	21
Procedimientos para la transferencia de embriones.....	21
<b>LABORATORIO DE AISLAMIENTO DE EMBRIONES .....</b>	<b>23</b>
Evaluación de embriones .....	23
Procedimientos para el aislamiento de los embriones.....	24
Llenado de la pajilla para embriones .....	24
Preparación del equipo de congelamiento.....	25
Cristalización.....	25
Etiquetado de las pajillas.....	25
Descongelado de los embriones.....	28
<b>LABORATORIO DE FERTILIZACIÓN <i>in vitro</i> .....</b>	<b>29</b>
Aspiraciones de oocitos.....	29
Procedimientos para la aspiración de oocitos .....	29
Búsqueda de oocitos .....	30
Maduración .....	31
Fertilización o fecundación .....	32
Medios de cultivo .....	32
Empajillado .....	32
<b>HIGIENE Y SEGURIDAD.....</b>	<b>34</b>
Uso adecuado del material y equipo para efectuar los procesos.....	34
Medidas de control de calidad y producción: Puntos críticos de control y riesgos ...	35
Control y manejo de residuos.....	36
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>41</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

1. Sincronización de vacas donadoras y receptoras en GRI.....	20
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Mecanismos de acción hormonal y sistemas de retroalimentación positiva y negativa en el eje hipotálamo, hipófisis y ovario .....	7
2. Esquema de la dinámica folicular en la hembra bovina. Mecanismos de las ondas foliculares .....	8
3. Esquema de superovulación con implante (CIDR <sup>®</sup> , Crestar <sup>®</sup> ) con celo de referencia (inducido) utilizado en la empresa GRI.....	14
4. Esquema de superovulación (SOV) utilizando PGF <sub>2</sub> $\alpha$ .....	15
5. Esquema de superovulación con el dispositivo intravaginal CIDR <sup>®</sup> .....	15
6. Esquema de llenado de una pajilla para T.E. utilizando como medio de crío preservación etilenglicol.....	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

1. Medicamentos, implantes y hormonas utilizadas.....	41
2. Colecta de embriones .....	42
3. Laboratorio de T.E. y fertilización <i>in vitro</i> .....	42

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día la tecnología de la reproducción animal ha alcanzado su mayor auge tanto en el mercado nacional como internacional, con el objetivo de mejorar las especies animales para el mercado y preferencias del consumidor. La Transferencia de Embriones (T.E.) surge con la medida de reproducir una mayor cantidad de animales de buena genética y fenotipo en un menor tiempo.

Hablar de la reproducción animal es un tema muy amplio, así que para una persona de poco conocimiento no le será fácil entender e interpretar lo que en este documento se describirá. Con el objetivo de facilitarle la comprensión al lector, se hablará de forma general del proceso reproductivo y en forma particular de la hembra bovina.

El propósito de realizar este manual es que sirva como una guía técnica del laboratorio y del manejo en general de un centro de reproducción animal de forma intensiva, donde el técnico encargado del laboratorio podrá familiarizarse con las diferentes técnicas y procesos en el manejo de un hato destinado a la reproducción animal asistida, haciendo énfasis con los diversos materiales utilizados y al manejo durante los procesos de reproducción.

Elaborar un manual técnico de T.E. de una empresa de servicios genéticos requiere de un análisis minucioso de todos los componentes y factores que la constituyen, estos factores tienen un efecto directo en el proceso de producción de la empresa y son los principales criterios a evaluar en el área de T.E. y fertilización *in vitro*, desde su producción hasta su comercialización.

La tecnología de T.E. ha cambiado las expectativas de los productores de ganado de leche y carne a nivel mundial, con el propósito de mejorar los hatos para obtener mejores rendimientos y con ello mayor beneficio económico.

Según Di-Bella (s.f.) el éxito económico de los programas de T.E. dependen de la genética utilizada, manejo del ganado, administración y mercadeo. Seleccionar la vaca donadora, el toro apto para el cruce, el manejo de las receptoras, programas de sincronización y superovulación, la educación y capacitación técnica del personal de campo para atender el manejo y la crianza de animales superiores, son los factores que afectan el resultado, costos y beneficios de los programas de T.E..

En los últimos años la actividad comercial de T.E. ha crecido mucho en los Estados Unidos y en países como Brasil y Colombia. La mayor parte de trabajo se realiza en ganado de carne y leche por la alta demanda de productos cárnicos y lácteos en el mundo.

Cada año ocurren de 40 000 a 50 000 preñeces por T.E. en ganado de carne comparado con un 20% en 1972, y aproximadamente el 90% de embriones transferidos provienen de ganado lechero. La actividad es relativamente costosa, por cabeza exceden los costos de sistema de producción estándar en cientos de dólares, teniendo un costo de mil dólares por cabeza (Taylor y Field 2001).

Así como la Inseminación Artificial (I.A.) se utiliza para aumentar la descendencia de toros de gran valor, la T.E. se utiliza para incrementar la producción de terneros de las mejores vacas. Puede utilizarse para inducir gestaciones gemelares, acelerar un programa de selección o para exportar animales a diversos países y eliminar el problema de adaptación a climas a través de mejoramiento genético (Phillips 2003).

Este manual tiene por objetivo normalizar las actividades que se llevan a cabo en las diferentes áreas de producción de embriones, así como también describir los procesos de operación para que los empleados estén más familiarizados con estas actividades y puedan realizar sus labores de manera eficiente.



## MATERIALES Y MÉTODOS

La empresa donde se elaboró el manual de transferencia de embriones está ubicada en el 22575 SH6 South Navasota, Texas 77868, EUA. La información necesaria para elaborar el manual fue recopilada durante los meses de enero a abril de 2007.

El manual de procedimientos para la transferencia de embriones es un documento donde se evalúan los procesos de manejo de vacas, sincronización de celo, evaluación de protocolos de superovulación, vacas donadoras donde se realizan aspiraciones para la fertilización *in vitro* y todo el proceso de manipulación de embriones en el laboratorio.

Estos aspectos son de interés para la mejora de la genética del hato y venta de genética al mercado. Es por eso que en Genetic Resources International (GRI) se evaluó todo el proceso de transferencia de embriones que consiste en puntos importantes para el seguimiento operacional con calidad.

Los puntos tratados en el manual son de alta importancia para un mejor manejo de la empresa, como es el equipo de preparación, los materiales que se están utilizando, en este caso también los animales con que se está tratando y el personal especializado. Para elaborar el manual, la toma de datos y recopilación de información debe ser precisa para evitar errores que conlleven a posibles defectos de producción. La recopilación de datos consistió en entrevistas al personal de trabajo y búsqueda de información, tanto en los archivos como en la literatura.

Las áreas que se evaluaron fueron:

- A nivel de campo:
  - 1) Vacas donadoras: Alojamiento, sanidad, nutrición, manejo, aspiraciones de oocitos, superovulación y colecta de embriones.
  - 2) Vacas receptoras: Alojamiento, sanidad, nutrición, manejo, sincronización de celos con vacas donadoras y transferencia de embriones.
- A nivel de laboratorio:
  - 1) Laboratorio de clasificación de embriones: Búsqueda de embriones, clasificación, empajillado, congelado, etiquetado y protocolos de congelado.
  - 2) Laboratorio de fertilización *in-vitro*: Búsqueda de oocitos, maduración, fertilización, medios de cultivo, empajillado, congelado y etiquetado.

De la empresa GRI & ST se consideran los siguientes puntos:

- Uso adecuado del material y equipo para efectuar los procesos.
- Medidas de control de calidad y producción: Puntos críticos de control y riesgos.
- Control y manejo de residuos.

## **TRACTO REPRODUCTOR DE LA VACA**

### **Anatomía**

Antes de hablar a profundidad sobre la T.E. 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).

En ciertos casos hay vacas que presentan anomalías en sus estructuras lo que hace que no sean aptas para ser inseminadas y preñadas o ingresar a un programa de T.E.

A continuación se presenta una descripción breve de las partes del tracto reproductivo de craneal a caudal:

- 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: Según Fosado<sup>1</sup> 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 la cérvix, ya que al momento del celo éste se abre para permitir la entrada del esperma.

Según Hincapié (2004) 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.

- 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 la 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).

### **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).

---

<sup>1</sup> Fosado, M. 2007. Cuerpo del útero. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.

#### - 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 (E<sub>2</sub>)

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).

Según Fosado<sup>2</sup> las altas concentraciones de E<sub>2</sub> inducen que:

- El cuerpo del útero esté turgente y produzca líquido uterino.
- La 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 (P<sub>4</sub>)

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<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)

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).

Órganos involucrados en el sistema endocrino (Figura 1):

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

---

<sup>2</sup> Fosado, M. 2007. Efecto de los estrógenos. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.

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 E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>.  
 Ovario: Lugar de acción del FSH y LH.

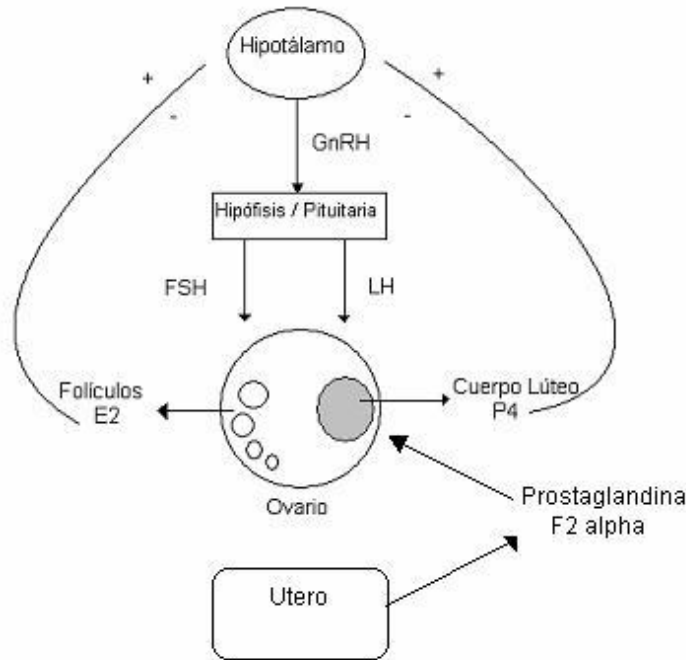
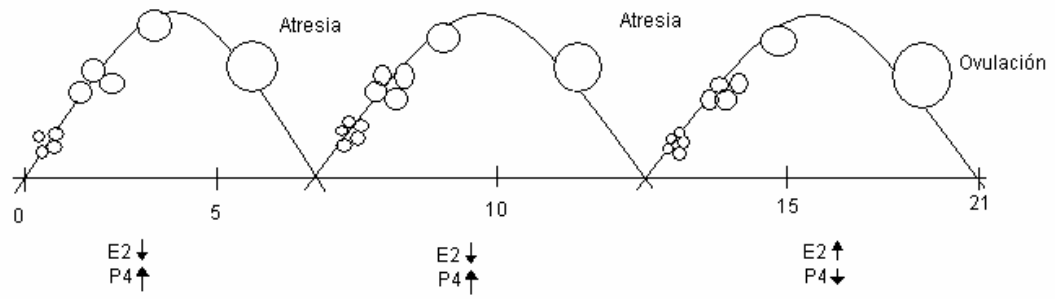


Figura 1. Mecanismos de acción hormonal y sistemas de retroalimentación positiva y negativa en el eje hipotálamo, hipófisis y ovario (Díaz 2007).<sup>3</sup>

### Ondas Foliculares

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

<sup>3</sup> Díaz, N. 2007. Mecanismos de acción hormonal y sistemas de retroalimentación positiva y negativa en el eje hipotálamo, hipófisis y ovario. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.



Estro: 21 días  
Celo: 18-24 horas  
Ovulación: 24-30 horas después de iniciado el celo

Figura 2. Esquema de la dinámica folicular en la hembra bovina. Mecanismos de las ondas foliculares (Díaz 2007).<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Díaz, N. 2007. Dinámica folicular en la hembra bovina. Mecanismos de las ondas foliculares. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.

## **FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS PROGRAMAS DE T.E.**

El obtener excelentes resultados en la T.E. depende de un sin número de aspectos a considerar, entre ellos se encuentran el tipo de protocolo que se use, las hormonas (drogas) con los que se trabaje, el estado nutricional de los animales, la raza, la edad, el clima y el manejo que se le esté dando a las vacas. La sumatoria de todos estos aspectos da como resultado el éxito o el fracaso en la T.E.

Los temas discutidos anteriormente sobre la anatomía y fisiología del sistema reproductivo de la vaca serán de mucha importancia para entender como funcionan los protocolos de superovulación (SOV) de donadoras y los protocolos de sincronización de receptoras, para la T.E.

Existe una variedad de protocolos, los cuales se adecúan a distintos parámetros y condiciones, en este documento se discutirán los protocolos usados en la empresa Genetic Resources International (GRI).

Aún teniendo los mejores conocimientos y experiencias sobre protocolos la respuesta de algunas vacas a ciertos protocolos de superovulación es incierta. Por eso, es necesario analizar muy de cerca todos los factores que afectan la respuesta de las vacas trabajadas a ciertos protocolos.

### **Factor hormona (droga):**

Las drogas deben ser aplicadas en las cantidades indicadas en el momento y la forma adecuada. Por eso, el técnico o la persona encargada debe estar bien capacitada, además de ser una persona muy responsable.

Las aplicaciones de la mayoría de estas drogas se hacen de forma intramuscular, se pueden poner arriba sobre la pierna o en la parte trasera sobre los muslos. Cuando se están haciendo las inyecciones de FSH se deben hacer en un intervalo de 12 horas, ya que la vida media de esta es de 5 horas; la mayoría de los centros genéticos utilizan el programa AM-PM. Si las vacas son inyectadas a las 6 de la mañana, se deben inyectar a las 6 de la tarde, durante los tratamientos de superovulación. Otro caso en la utilización de hormonas para la superovulación es el uso de eCG (Gonadotropina coriónica equina) que causa problemas cuando se usa en exceso en la ovulación de los folículos y embriones de mala calidad (Becaluba 2007).

Además se debe tomar en cuenta las legislaciones del país sobre la hormona que se está usando; ya que tienden a ser diferentes de un país a otro. Este debe ser el

primer criterio a considerar cuando se va a desarrollar un proyecto de trabajar en un nuevo país.

### **Factor nutrición:**

Según Castro<sup>5</sup> la condición corporal óptima para trabajar una vaca y obtener buenos resultados, en una vaca de carne es de 5 a 6 y en una lechera es de 2.5 a 3.0.

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

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

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

### **Factor raza:**

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

Esto muestra el efecto que tienen las razas sobre la respuesta a las hormonas, tal es el caso de la FSH en el tratamiento de SOV, por lo cual se debe analizar bien antes de implementar los programas de T.E.

Según Castro<sup>6</sup> otro aspecto muy importante sobre el factor raza es que las vacas *Bos indicus* al ser aspiradas para hacer fertilización *in vitro* dan mayores cantidades de oocitos que las razas europeas.

---

<sup>5</sup> Castro, A. 2007. Condición corporal. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.

<sup>6</sup> Castro, A. 2007. Influencia en la raza en la aspiración de oocitos. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.



**Factor edad:**

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

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

**Factor clima:**

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

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

**Factor Protocolo:**

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

## VACAS DONADORAS

Estas vacas son seleccionadas como donadoras según sus cualidades o rasgos genotípicos y fenotípicos, o simplemente porque el cliente las considera unas excelentes vacas.

### **Alojamiento**

Las vacas son alojadas en grupos de 20, preferiblemente vacas de igual raza o del mismo propietario, estas permanecen en cuadras de 2500 m<sup>2</sup> aproximadamente, con el objetivo de tener un mejor control sobre las actividades que se realizan a diario. Las vacas donadoras deben estar en un ambiente confortable, con alimento, agua y minerales permanentemente.

### **Identificación**

Todas las vacas tienen un número que las identifica en el registro nacional de los Estados Unidos, esto facilita el control de cualquier tipo de enfermedad. Es por esta razón que las vacas que ingresan a la compañía tienen que llevar un expediente, donde el cliente hace constar que la vaca está en excelentes condiciones sanitarias para ser trabajadas, de lo contrario no pueden ser aceptadas en la compañía. Cuando los embriones producidos por GRI son para exportación se les extrae una muestra de sangre a las vacas, para hacerles exámenes serológicos y certificar según el acuerdo internacional de exportación de embriones que la vaca esta libre de enfermedades transmisibles.

### **Nutrición**

Cuando las vacas ingresan a las instalaciones de la compañía, se les hace una evaluación de condición corporal, todas las vacas de razas cebuínas que tienen una condición corporal por encima de 8 en una escala del 1 al 10, son sometidas a dietas, que consisten en eliminar la alimentación a base de concentrados y fardos de alfalfa, alimentándolas únicamente con rollos de Ray Grass (*Lolium perenne*) de 1000 libras (455 Kg) cada rollo. Las vacas que tienen una condición corporal por debajo de 5 se alimentan con rollos de Alfalfa de 2000 libras (909 Kg) y Ray Grasss, además de una ración de concentrado con 18% de proteína, esta depende del tiempo que llevan en las instalaciones de la compañía, inician con raciones de 4 libras (1.82 Kg) diarias por vaca cuando recién ingresan, hasta llegar a raciones de 10 libras (4.55 Kg) por vaca cuando ya están adaptadas a las condiciones y al tipo de alimento. Estas vacas no son trabajadas hasta que tienen una condición corporal aceptable, arriba de 5, en la escala del 1 al 10. Lo mismo se hace con las vacas taurinas, la diferencia radica en que la evaluación de la condición corporal se hace de 1 a 5.

**Manejo**

Al momento de recibir las vacas, el veterinario de la compañía es el encargado de revisar sus expedientes médicos, hacerles un examen clínico para determinar si el animal presenta algún tipo de enfermedad que perjudique a los demás animales presentes en la empresa.

Una vez terminado los exámenes y comprobar que el animal está en buenas condiciones, la información será archivada y utilizada al momento que vuelvan a ser tratados o para que el cliente conozca el tratamiento que se esta dando al animal.

En los Estados Unidos cada animal tiene su registro dentro del cual se hace constar que ha sido tratado contra enfermedades como tuberculosis, brucelosis y otras enfermedades. Para la compañía recibir este tipo de información es de suma importancia, ya que no se puede recibir un animal que no sea registrado. Si es un animal de origen extranjero tiene que llevar un registro del país de origen.

Después son llevadas a una cuadra o pastura de aproximadamente 2500 m<sup>2</sup> donde están establecidos los comederos, saleros y los estanques de agua. Las vacas que vienen por primera vez a la compañía se les colocan un arete con un número de inventario que la identificará dentro de la misma.

Una vez establecidas en las pasturas, son alimentadas con rollos de alfalfa de 2000 libras (909 Kg), una semana después, son palpadas y chequeadas con el ultrasonido. Se analiza el estado de todo el tracto reproductor en especial los ovarios.

**Cantidad de vacas donadoras**

La cantidad de vacas donadoras a trabajar depende de la respuesta que estas presenten a los protocolos de superovulación y la cantidad de receptoras disponibles, cuando se desea transferir los embriones en fresco es decir sin necesidad de congelarlos. En el caso particular, GRI tiene la facilidad de congelar los embriones cuando sobran y lo contrario, poner embriones congelados cuando hay sobrantes de receptoras en sincronización. Estos trabajos son poco comunes porque dependen de lo que el cliente quiere.

**Protocolos de superovulación de vacas donadoras**

Existen varios protocolos de superovulación de vacas. Los protocolos pueden variar en tiempo, cantidad de dosis y al manejo que se le dan. Al seguir con las indicaciones de los protocolos se debe tener la mayor disposición y responsabilidad, ya que al cometer un simple error se estaría perdiendo todo el tratamiento que se le esta suministrando a la vaca.

A continuación se describirán tres protocolos que se están utilizando en la empresa de Genetic Resources International (GRI).

El protocolo que utiliza el celo de referencia inducido (Figura 3), consiste en seleccionar las vacas donadoras que se van a superovular sin tomar en cuenta en que fase del ciclo estral se encuentran, todas son implantadas el día 0 con CIDR<sup>®</sup> o CRESTAR<sup>®</sup>, además de aplicar una dosis de 2 mL de Benzoato de Estradiol (BE); luego el día 7 se remueve el implante, el día 8 se aplica una dosis de 1 mL de BE; después se da un rango de tres días para que las vacas presenten un celo de referencia, este es inducido con el implante y las aplicaciones de Benzoato de Estradiol (BE), de aquí toma el nombre de “Protocolo con celo de referencia inducido”, durante este tiempo es importante asegurarse que las vacas demuestren que están en celo. Si lo que se quiere es únicamente preñar la vaca, se hace la I.A. entre 32 y 35 horas después de la última aplicación de BE, a esto se le conoce como Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (I.A.T.F.); sin embargo, si a la vaca se le va a hacer lavado de embriones, al día 19 se hace una palpación para Cuerpo Lúteo (CL), las vacas que presentan CL son sometidas al tratamiento de superovulación (SOV), este se hace con aplicaciones de FSH por la mañana y la tarde en dosis decrecientes durante 4 días; los días 3 y 4 del tratamiento de SOV se hacen aplicaciones de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Lutalyse<sup>®</sup>) para lisar el CL y se produzca el efecto de la LH, que es la ovulación de todos los folículos maduros en un rango estrecho de tiempo, no todos van a ovular al mismo tiempo, es por eso que las vacas son inseminadas dos veces, para cubrir con ese rango de tiempo que la vaca pasa en ovulación. La SOV se produce por que la presencia del CL, quien mantiene elevados los niveles de progesterona, inhibe la LH y ayuda a ejercer la función de la FSH, esta última se encuentra en altas concentraciones en la sangre por las aplicaciones exógenas que se realizan y hace madurar no solo un folículo sino varios. Es por eso que el tercero y cuarto día de las aplicaciones de FSH también se aplica PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Lutalyse<sup>®</sup>) para lisar el CL y se produzca la ovulación; el protocolo finaliza al día 31 cuando se realiza el lavado de embriones.

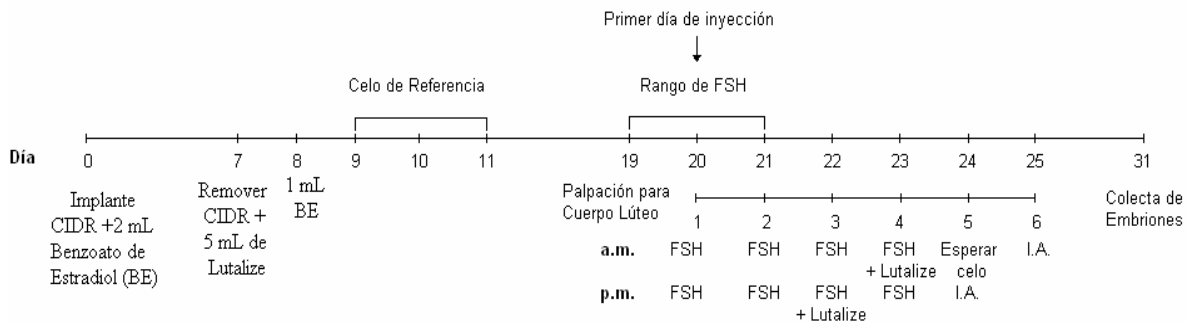


Figura 3. Esquema de superovulación con implante (CIDR<sup>®</sup>, Crestar<sup>®</sup>) con celo de referencia (inducido) utilizado en la empresa GRI.

El protocolo de SOV con Prostaglandinas (Figura 4), utiliza el celo de referencia natural, esto es lo que lo diferencia del protocolo anterior. Es decir en este caso el celo no es inducido. El día 0 se palpan las vacas donadoras, las que presentan un CL, se les aplica PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , luego entre los días tres y cinco hay un celo esperado, el cual debe ser monitoreado, vigilando de cerca el comportamiento de las vacas. Después el día 14 se hace otra palpación para CL solo en las vacas que fueron tratadas con PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , el día 15 se inicia la aplicación de FSH en las vacas que presentaron CL, se hace la IA a los días 19 y

20 y la colección de embriones al día 26. Con este protocolo se pueden ahorrar 5 días comparado con el protocolo anterior.

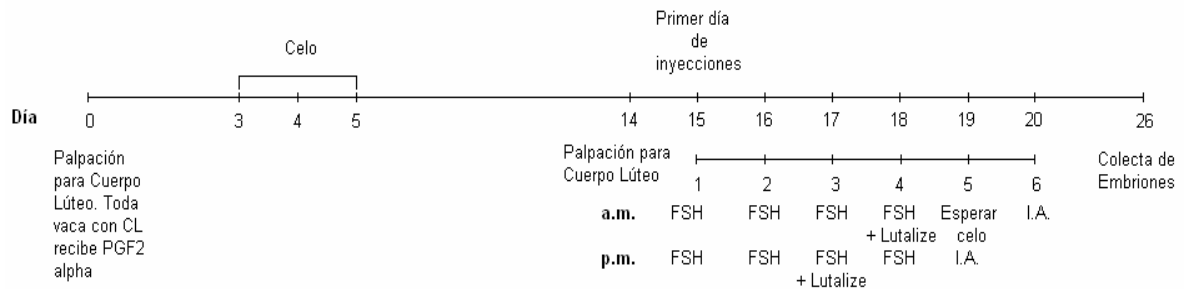


Figura 4. Esquema de superovulación (SOV) utilizando  $PGF_{2\alpha}$ .

El protocolo de SOV con CIDR<sup>®</sup> (Figura 5), utiliza el celo natural de referencia. Este es una combinación de los dos protocolos anteriores, por que se usa un implante CIDR<sup>®</sup> como en el primer protocolo y se trabaja con el celo natural de referencia como en el segundo protocolo. Al día 0 se hace la aplicación a las vacas donadoras, las que presentan un CL definido se les coloca el implante CIDR y 2 mL de BE, luego al día 4 se inician las aplicaciones de FSH (AM-PM), después los días 8 y 9 se realiza la IA y al día 15 la colecta de embriones. Con este protocolo se puede ahorrar 15 días comparado con el primer protocolo.

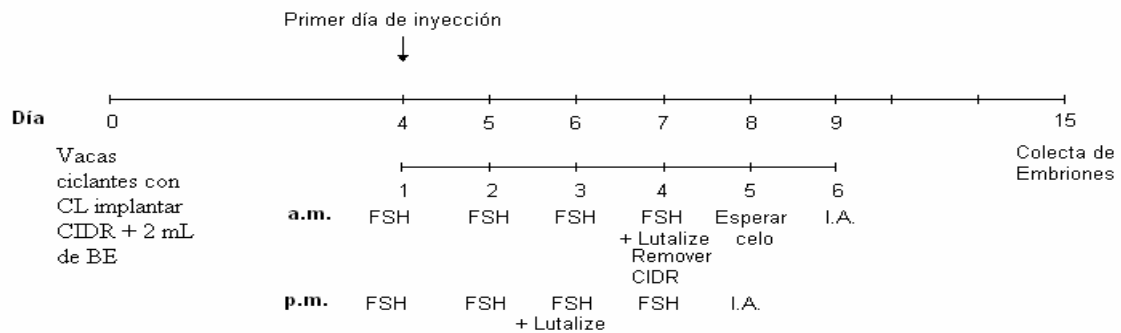


Figura 5. Esquema de superovulación con el dispositivo intravaginal CIDR<sup>®</sup>.

### Colecta de embriones

Según Görlach (1999) la colecta de embriones se hace al día 7 después de la primera I.A. de la vaca donadora, mediante un lavado uterino transcervical. En este momento se puede encontrar embriones en estadios de mórula y blastocisto, estos son más estables que los demás estadios, lo que hace posible que sean transferidos directamente (transferencia en fresco) o que resistan a actividades como la congelación y micromanipulación. El hecho de establecer a nivel mundial que la colecta se debe hacer el día 7 después de la primera

I.A., estandariza la valoración y manipulación de los embriones para la comercialización, además facilita la sincronización de las receptoras.

### **Materiales:**

**Mesa para la instalación de materiales.** Debe ser lavada y desinfectada previo a su uso. Se puede lavar con detergente y agua normal, luego se desinfecta con una solución de clorhexidina y agua.

**Ecógrafo.** Es instalado sobre la mesa para materiales, en este caso, es utilizado para ver la cantidad de CL en cada ovario y hacer una evaluación de la calidad de trabajo que se realizó; evaluar si se colocaron las dosis de hormonas adecuadas en el momento requerido, evaluar la eficiencia del equipo de trabajo, tanto la del técnico que realiza el lavado como la del encargado de buscar e identificar los embriones en el laboratorio; contando los CL se puede estimar cuantos embriones deben salir al final de todo el proceso de colecta y búsqueda de embriones. Cabe aclarar que se puede estimar la cantidad de embriones pero no la calidad o grado de los mismos. Existen casos en los cuales el número de embriones es alto, pero solo dos o tres son de buena calidad y están aptos para la transferencia.

**Varios.** Guantes de palpación, gel usado como lubricante, papel de limpieza, jeringas y agujas para la aplicación de Lidocaína como anestésico.

**Catéter de Folley.** Es un tipo de sonda que permite la entrada de medio de lavado al cuerpo del útero y las trompas de Falopio; al igual que permite el drenaje del medio, haciendo una evacuación de los embriones al ser arrastrados por el medio de lavado. Existen de diferentes medidas, estas van desde 16 hasta 22 pulgadas, por lo general las medidas menores son utilizados en novillas, ya que tienen un tracto reproductor más pequeño.

Al hacer un corte transversal de un catéter de Folley se puede apreciar que en el centro tiene un orificio, seguido hacia la parte exterior, tiene una capa sólida, luego hay otro espacio libre y termina con otra capa sólida. La parte anterior del catéter tiene una forma redonda y un orificio que lo atraviesa transversalmente, cuando este es introducido en el tracto, esta parte queda dentro del cuerpo del útero y para que no se salga se infla inyectándole aire o medio de lavado desde el exterior, a esto se le conoce como “Balón” debido a que la parte anterior adquiere la forma de un pequeño balón. Es por eso que la parte posterior termina en una V, una entrada es para introducir el estilete y la otra para inflar el balón.

**Estilete.** Es una varilla metálica en acero quirúrgico. El estilete se introduce en el catéter Folley por el orificio central que este tiene para que le de rigidez y pueda pasar por la cervix, al momento de hacerlo se debe tener el cuidado de no sacar la punta del estilete por el orificio transversal que tiene el catéter en la parte posterior, ya que puede lastimar las paredes de la cervix. Este es uno de los problemas más comunes que se presenta con personas que están aprendiendo la técnica.

**Filtro.** Es un recipiente de boca ancha y fondo angosto, posee una tapadera con dos orificios; uno pequeño que es para la entrada de aire, necesario al momento de drenar el medio y otro que va conectado a la manguera que viene de la conexión con el catéter de Folley y el medio de lavado. La reddecilla encargada de filtrar esta ubicada en la pared del recipiente, esta tiene una ligera inclinación hacia la parte interna del recipiente. Después de la reddecilla hay un orificio de salida, usado para drenar el medio del filtro. Los embriones quedan atrapados por esta reddecilla. Cuando se termina la colecta el filtro se pasa al laboratorio.

**Medio de lavado.** Se usa entre uno o dos litros de Suero Fetal Bovino (SFB) al 1% de albúmina como medio de lavado. Al momento de hacer el lavado la bolsa que contiene el suero debe estar en una parte alta, ya que todo el sistema trabaja por medio de la fuerza de gravedad. Antes de ser usado el suero debe pasar por el baño María, y asegurarse que su temperatura sea igual a la temperatura corporal de la vaca.

#### **Procedimientos de colección de embriones:**

Para poder colectar los embriones de una vaca donadora que pasó por un proceso de sincronización y superovulación se necesitan los siguientes procedimientos:

Primero el área de trabajo deberá estar en buenas condiciones para no estresar a la vaca y desinfectada para evitar cualquier contaminación. Los equipos y materiales necesarios para colectar embriones deben estar preparados una vez la vaca esta en la prensa, los cuales también deben estar esterilizados (en caso de reutilizar materiales) y listos para poder empezar a colectar. En GRI no se reutilizan materiales de este tipo, son usados una vez y luego se desechan. Los medios que se utilizan para colectar deben estar en baño María a una temperatura de 37°C, similar a la temperatura corporal de la vaca, para evitar el choque térmico a los embriones. El área de trabajo debe estar a una temperatura ideal, tal es el caso que hace mucho frío utilizar calentadores.

Una de las ventajas es que los embriones son bastante tolerantes a temperaturas ambientales 25-35°C, pero según Görlach (1999) no se debe superar bajo ningún concepto una temperatura ambiente menor a 20°C.

Cuando la vaca está en la prensa se le aplica anestesia epidural Lidocaína al 2% con una dosis de 5 a 10 mL entre las articulaciones del sacro y la primera vértebra coccígea.

Para realizar la colecta de embriones se necesita una sonda (catéter de Folley) que servirá como un tubo donde pasará el medio y los embriones. El estilete se introduce en el catéter de Folley para pasarlo por el cérvix hasta llegar al cuerpo del útero, una vez pasado por el cérvix se infla el balón para sellar la unión del cérvix con el cuerpo del útero y evitar que se salgan los embriones. Según González Fernández (2001) el balón se infla con aire de 15-25 mL en animales adultos y 10-15 mL en el caso de novillas. Una vez colocada la sonda, debe estar preparado el medio de lavado (SFB 1% + albúmina) el cual debe estar en el baño María. El ayudante debe conectar la bolsa del medio con la sonda y el filtro, también el técnico debe de asegurar que el medio tenga un reflujo hacia el filtro para comprobar que la sonda esta bien colocada, si no hay reflujo del medio, se debe reubicar la sonda de nuevo. Al realizar el lavado el técnico debe hacer unos masajes en el útero de

la vaca para poder coleccionar los embriones a través de la sonda y hacerlos llegar hasta el filtro. La colecta de los embriones con el medio se hace 1 o 2 veces, usando por lo menos un litro de medio por colecta. Una práctica común es hacer el primer lavado, luego se saca a caminar la vaca al corral, dejándole medio de lavado en el útero y la sonda con el balón inflado, para evitar que este se desinfe se utiliza el émbolo de una jeringa de 5 mL, esta se coloca a presión en la parte de la sonda por donde se infla el balón, se deja ahí para evitar el vacío y así el balón no se desinfe. Esta práctica ayudará porque la vaca al caminar hará mover el medio contenido en el útero y en los cuernos, estos movimientos provocará el desprendimiento de algunos embriones que quedaron atrapados en las paredes. Luego la vaca se vuelve a la prensa y se le hace el segundo lavado.



## **VACAS RECEPTORAS**

Görlach (1999) establece que la selección de receptoras requiere de varios aspectos y procedimientos a considerar para el buen desempeño en la T.E. La selección de la receptora desde el punto de vista genético no tiene mayor consecuencia en la T.E.; aunque no se debe descartar el efecto que tiene la habilidad materna (como carácter genético), las óptimas condiciones de clima, el buen manejo y la excelente alimentación sobre la implantación y el desarrollo de los embriones transferidos. Por tanto Görlach (1999) concluye que toda vaquilla sexualmente adulta y sin patologías reproductivas, así como toda vaca sana y sin trastornos ginecológicos puede ser tomada como una receptora. Entiéndase por patologías reproductivas la aciclia, ninfomanía y endometritis; y por anormalidades ginecológicas a los órganos sexuales femeninos y hermafroditismo.

Las receptoras deben ser cruza de razas lecheras y razas cebuínas, ya que las vacas receptoras cruzadas son animales más fértiles, presentan una mayor habilidad materna para la crianza de los terneros y también se adaptan mejor a condiciones adversas del medio.

### **Alojamiento**

Las vacas receptoras son alojadas en grupos de 20 a 30 animales por corral, éstas permanecen en cuadras pequeñas de 2500 m<sup>2</sup>, con el objetivo de tener un mejor control sobre las actividades que se realizan a diario. Las vacas receptoras al igual que las donadoras deben estar en un ambiente confortable, con alimento, agua y minerales permanentes.

### **Sanidad**

Todas las vacas receptoras que vienen de otras fincas para su manejo en la T.E. deben tener un registro que describen que son vacas que están en buenas condiciones y dentro de la empresa deben tener un registro que las identifique para el momento de transferir los embriones. Es por esta razón que las vacas que ingresan a la compañía deben tener un expediente que acredita que el animal está libre de enfermedades, de lo contrario no pueden ser aceptadas.

### **Nutrición**

Cuando las vacas ingresan a las instalaciones de la compañía, se les hace una evaluación de condición corporal, todas las vacas receptoras deben tener una condición corporal de 2.5 a 3.0. La alimentación de las receptoras es a base de rollos de alfalfa y ryegrass. Estas vacas no son alimentadas con concentrado.

## Manejo

El manejo que se le da a las receptoras al momento de llegar a la empresa es un chequeo por palpación para determinar el estado del sistema reproductor y la factibilidad de uso. Al pasar por el chequeo se les incorpora un arete que lleva el número de registro de la empresa y después son llevadas a los corrales correspondientes manteniéndolas con alimento, minerales y agua hasta el momento de la T.E.

## Sincronización de celo

Al momento de sincronizar las vacas receptoras se debe tomar principalmente en cuenta la sincronización de las vacas donadoras si va a ser T.E. en fresco y también cuando los embriones van a ser congelados. Cuando la T.E. es en fresco las receptoras al momento de sincronizar deben estar en celo el mismo día que las donadoras, para que al momento de transferir coincida la misma secuencia de ovulación y favorecer la preñez para las vacas receptoras una vez haya sido transferido el embrión. Cuando el embrión es congelado, las vacas receptoras se sincronizan solo para que entren en celo y esperar 7 días para transferir el embrión. En el Cuadro 1 se muestra el protocolo en particular que utiliza GRI para sincronizar las vacas donadoras y receptoras.

Cuadro 1. Sincronización de vacas donadoras y receptoras en GRI (Díaz 2007).<sup>7</sup>

DIA	DONADORAS		RECEPTORAS	
	Fecha	Evento	Fecha	Evento
0	23/02/07	Celo Natural		
1				
2				
3			26/02/07	CIDR in + 2 mL BE
7	03/02/07	Palpación para CL		
8	03/03/07	AM: 2.2 mL FSH PM: 2 mL FSH		
9	04/03/07	AM: 1.8 mL FSH PM: 1.6 mL FSH		
10	05/03/07	AM: 1.4 mL FSH + 3 cc de PGF <sub>2α</sub> PM: 1.2 mL FSH + 2 cc de PGF <sub>2α</sub>	05/03/07	CIDR out + 5 cc PGF2 alpha
11	06/03/07	AM: 1.0 mL FSH PM: 0.8 mL FSH	06/03/07	1 cc de BE
12	07/03/07	AM: Celo esperado PM: Primera IA	07/03/07	Celo esperado
13	08/03/07	AM: Segunda IA PM: Tercera IA		
19	14/03/07	Colecta de embriones	14/03/07	Transferencia de embriones

<sup>7</sup> Díaz, N. 2007. Sincronización de vacas donadoras y receptoras. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.

### **Transferencia de embriones**

Cuando las receptoras entran en celo son llevadas a la manga y son chequeadas para determinar en qué ovario está presente el cuerpo lúteo (C.L.), porque es allí en el cuerno ipsilateral al C.L. en donde se va a transferir el embrión.

Por lo general los procedimientos para transferir los embriones son similares como es la I.A. Los catéteres y pistolas son más largos, ya que son introducidos hasta el cuerno uterino.

En el laboratorio se lleva un registro del embrión con el nombre del toro, la vaca donadora y el número de la vaca receptora a la cual va a ser introducido el embrión.

En la vaca receptora se implanta un arete adicional con el número de vaca donadora, el número del toro y la fecha aproximada del parto.

### **Procedimientos para la transferencia de embriones**

- Traslado de vacas receptoras de las pasturas a la manga: Estas vacas no se deben someter a estrés, cuando se arrean se trata de no hacerlas correr. Por lo general las vacas se mantienen en una misma pastura ya que serán transferidas con los embriones el mismo día, porque de lo contrario al momento de separarlas de las demás en el corral, son sometidas a estrés. Se obtienen mejores resultados cuando la vaca está relajada. La vaca es encaminada sobre la manga hasta llegar a la prensa.
- Evaluación de la receptora: Éste es un momento clave en la T.E. La evaluación queda a criterio del técnico encargado de hacer la T.E., él decide si se va transferir el embrión o no. Se hace una palpación rectal y se utiliza el ecógrafo para ver el estado del C.L. Si a la vaca se le va a transferir el embrión, se le pone una marca sobre la grupa del lado donde se encontró el C.L., que es el lado donde se hace el implante.
- Armado de la pistola de transferencia: Esta labor la realiza el ayudante del técnico encargado de la T.E.. Si no hay una persona que le ayude, tiene que armar la pistola él mismo, lo cual resulta muy tedioso y hace ineficiente el proceso. Una vez que la pajuela (0.25 mL) esta descongelada el técnico prepara la pistola de T.E., toma la pajuela que contiene el embrión cuidadosamente por el extremo donde está el sello de algodón, la introduce por la punta de la pistola de T.E., de la misma forma como se haría al colocar una pajilla de semen en una pistola de I.A. Luego se introduce la pistola que contiene la pajuela con el embrión dentro de la funda para la T.E., ésta es igual a una funda de I.A. diferenciándose en la longitud, siendo algo más largo y en el color (azul para T.E.), además presenta una punta de metal con dos orificios laterales en la cual va a salir el embrión. Para finalizar la preparación de la pistola de T.E. se coloca una camisa protectora estéril plástica que lo protege con cualquier suciedad una vez se introduce por la vagina de la vaca.
- Preparación de la vaca receptora una vez está en la manga: Se le inyecta una anestesia epidural para bloquear los movimientos rectales y el músculo del esfínter anal, pero

antes se le hace una limpieza en el lugar donde se va a inyectar para evitar cualquier infección. Se aplica de 5 a 10 mL de Lidocaína al 2% entre las articulaciones del sacro y la primera vértebra coccígea. Para comprobar que se colocó la jeringa en el lugar indicado se hala el émbolo asegurándose que la aguja no está dentro de un vaso sanguíneo. Una vez terminada la preparación de la pistola se procede a la transferencia del embrión (Moreno 2004).

- Identificación de la vaca transferida: Después que finaliza la transferencia se coloca un arete en la oreja derecha con la información correspondiente de que la vaca ha sido transferida. Estas vacas se llevan a una pastura a parte de las demás receptoras que no fueron transferidas con un embrión. Un mes después de la transferencia se hace una palpación rectal utilizando el ecógrafo para verificar si están preñadas. Las que quedan preñadas se les deja el arete que se les puso en la oreja derecha y las que no quedaron preñadas se les remueve el arete y se vuelven a las pasturas con las demás receptoras vacías.

## **LABORATORIO DE AISLAMIENTO DE EMBRIONES**

El área del laboratorio de búsqueda y clasificado de embriones (aislamiento), debe estar siempre limpia. Aquí se guardan las pistolas de inseminación, catéter de Folley, camisas sanitarias, desinfectantes para las manos, baño maría, pistolas para T.E., fundas para transferencia e inseminación, termostatos, estereoscopio, microscopios, etc.

El filtro que contiene los embriones es pasado al laboratorio de búsqueda y clasificación de embriones. Se debe procurar que quede una cantidad suficiente de medio en el filtro para que facilite el aislamiento de los embriones.

### **Evaluación de embriones**

- Nomenclatura del desarrollo embrionario (Moreno 2004).

Días de vida

0	Huevo sin fertilizar después de la ovulación.
1	Fertilización hasta la primera división celular.
2	Embrión de dos células.
3	Embrión de cuatro células.
4	Embrión de ocho células.
5	Embrión de dieciséis células.
6	Mórula.
7	Blastocito.
8	Blastocito expandido.
9	Blastocito eclosionado.

- Grados o códigos de calidad de los embriones

El rango para la calidad de los embriones es de 1-4:

Grado 1	Excelente o bueno: Embriones uniformes en color tamaño y densidad.
Grado 2	Regular: Moderadamente presenta irregularidades en los embriones individuales en tamaño, color y densidad.
Grado 3	Pobre: Presenta mayores irregularidades en la masa del embrión en el tamaño color y densidad de las células individuales.
Grado 4	Degenerado: Embriones de una sola célula, estos embriones no son viables.

El embrión que se comercializa a nivel internacional es del grado 1 (Robertson 2002).

### **Procedimientos para el aislamiento de los embriones**

Al finalizar la colecta de los embriones el técnico del laboratorio debe tener el equipo listo y preparado para buscar y manipular los embriones, se pasa el filtro al laboratorio y se hace dos lavados, inclinándolo a 45° con una jeringa al cual se toma del medio de lavado que se utiliza en la colecta de los embriones, se lava primero en la parte donde está la redcilla para asegurar que los embriones no queden adheridos, cada vez que se lava el filtro se pone el medio en el plato de búsquedas, al tener todo el medio en el plato de búsqueda se procede a buscar los embriones (el plato contiene unos cuadros divididos del 1 al 5 en forma vertical y de la A a la E en forma horizontal), para esto se usa el estereoscopio con el lente adecuado a la vista de la persona encargada para que facilite la búsqueda, preferiblemente utilizar luz difusa con aumento de 10 o 20. Se debe buscar bien cualquier embrión u oocito sin fertilizar para comprobar el rendimiento del programa de sincronización e inseminación. Se realizan de 2 a 3 búsquedas en el plato para encontrar el número máximo de embriones. Al iniciar una búsqueda se remueve el medio contenido en el plato. Cuando se identifica un embrión, se toma una micropipeta con una punta nueva, se extrae cuidadosamente el embrión y se pasa a otro plato llamado plato de mantenimiento (plato con seis pasos), se le llama así por que sobre el existen 6 compartimentos, con una capacidad de 5 mL de medio cada uno, uno se ubica al centro del plato y los otros 5 alrededor de este. En cada uno de estos compartimentos se ponen 2 mL de medio de mantenimiento (holding). El embrión que se va identificando se pasa al compartimento del centro. Luego se pasan por los demás y a cada uno se conoce como un paso, por eso se dice que el plato tiene 6 pasos. Cabe mencionar que todos los materiales deben estar en una plancha térmica (termostato) a 37°C.

Cuando se hayan encontrado todos los embriones y se pasaron al plato de mantenimiento, el cual tiene una solución de SFB 10%, se hará una limpieza del embrión, eliminando cualquier suciedad. Este método consiste en varios pasos: Los embriones tiene que pasar por cinco pasos de la solución de mantenimiento (holding en inglés), seguido de dos pasos en una solución de tripsina (proceso de eliminación de agentes contaminantes cercanos al embrión) en la cual los embriones deben permanecer de 30-40 segundos, si se deja demasiado tiempo, se puede dañar los embriones. Es necesario estar bien concentrado en el trabajo del laboratorio; para finalizar el proceso de mantenimiento se debe pasar de nuevo otros cinco pasos de mantenimiento para limpiar los residuos de tripsina.

Los embriones usados para la exportación deben pasar por los 12 pasos, 5 en holding, 2 en tripsina y 5 en holding de nuevo. Los que se usan para la misma compañía se pueden pasar únicamente por los 7 primeros pasos.

### **Llenado de la pajilla para embriones**

Antes del llenado de las pajillas los embriones deben estar en una solución de glicerol o etilenglicol, según las especificaciones del cliente, en un tiempo de 5 a 7 minutos. Se recomienda usar un plato diferente para tener los embriones en el glicerol o etilenglicol.

Para llenar las pajillas se usa una jeringa, la cual se le adhiere la pajilla donde va a estar el embrión. Para llenarla, primero se llena de solución de glicerol o etilenglicol, luego un

espacio de aire; en el siguiente espacio deberá ir el embrión en la solución (porción media de la pajilla), seguido de un espacio de aire y al final de solución de glicerol o etilenglicol. De esta manera el embrión queda situado en el segmento central de la pajuela entre las dos burbujas de aire. El aire que se le adhiere a la pajilla es para que al momento de transferir el embrión no se quede en la pajilla y salga sin ningún problema (Figura 6).

Al finalizar el llenado se debe sellar la pajilla al extremo donde no se encuentra el algodón dentro de la pajilla con la máquina selladora por calor, teniendo el cuidado de no dañarlo. Una vez sellado se procede al proceso de congelación.

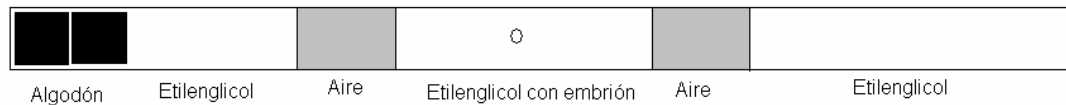


Figura 6. Esquema de llenado de una pajilla para T.E. utilizando como medio de crío preservación etilenglicol.

### **Preparación del equipo de congelamiento**

Se utiliza alcohol etílico al 70% para el proceso de congelado ya que su punto de congelamiento es a  $-50^{\circ}\text{C}$ . Al preparar el equipo se debe tener un punto de partida donde se empieza a congelar las pajillas y un punto final con un rango de descenso de  $-0.53^{\circ}\text{C}$  por minuto:

Punto de partida	$-0.60^{\circ}\text{C}$
Punto final	$-34.0^{\circ}\text{C}$

### **Cristalización**

Para cristalizar el medio que está dentro de las pajillas hay que colocarlas en el equipo de congelamiento a  $-0.60^{\circ}\text{C}$  de 2 a 3 minutos, tener lista una barra de cobre dentro del tanque de nitrógeno líquido, la cual se usará para frotar o pasarla por las pajillas que están dentro del equipo y favorecer la cristalización (en inglés se conoce como seeding), después de pasar la barra de cobre por las pajillas se dejan reposando en el equipo en un tiempo de 10 minutos a  $-0.60^{\circ}\text{C}$ . Después se inicia el descenso de temperatura de  $-0.53^{\circ}\text{C}$  por minuto. Al llegar al punto final de temperatura ( $-34^{\circ}\text{C}$ ) las pajillas son llevadas al tanque de congelamiento con nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Por lo general todo el proceso del congelamiento tarda alrededor de una hora.

### **Etiquetado de las pajillas**

Cuando las pajillas están en el proceso de congelamiento en el equipo, se debe preparar las etiquetas con la respectiva información de las pajillas. A continuación se presenta un ejemplo de la información que lleva una pajilla.

1 DT 1279 AN 14763076 N256 AN 14542822 SUM. PFRED ON12 1 EMB. 4-1 07MR14

1. Número de la pajilla (1)
2. Tipo de solución que se utilizó para el congelamiento. Por ejemplo DT: si es en congelado en etilenglicol.
3. Número del laboratorio que realiza T.E. (registro: 1279).
4. Raza (AN: Angus).
5. Número de registro de la vaca (14763076).
6. Nombre de la vaca (N256).
7. Raza de la vaca (AN: Angus).
8. Número de registro del toro (14542822).
9. Nombre del toro (opcional, por ejemplo SUM. PFRED ON12).
10. Número de embriones.
11. Grado y calidad del embrión.
12. Fecha de colecta y congelamiento.

A continuación se describe un esquema resumido del aislamiento de los embriones en la empresa GRI:

1. Preparación del equipo de manipulación de embriones.
  - Termostato (36.5°C), estereoscopio, jeringas, agujas, medio de lavado del filtro y mantenimiento, platos de manipulación de embriones (búsqueda, holding), tripsina.

Una vez terminada la primera o segunda colecta:

2. Lavado del filtro de embriones.
  - Empezar el lavado en la parte donde está la malla del filtro a una inclinación de 45° y colocar el medio con los embriones en los platos de búsqueda.
  - Usar una jeringa de 20 mL para lavar el filtro utilizando el medio de lavado SFB al 1% con aguja hipodérmica desechable calibre 20G \* ½”.
  - Hacer de 2 a 3 lavados en el filtro de embriones.
3. Búsqueda de embriones.
  - Usar platos de búsqueda a temperatura de 37°C (mantener los platos de búsqueda sobre un termostato). Para identificar el plato de búsqueda se escribe el número de la vaca sobre uno de los costados del plato.
  - Solamente al momento de hacer la búsqueda los platos no están sobre el termostato.
  - Para facilitar la búsqueda, los platos están marcados con líneas horizontales y verticales en la base, estas líneas forman cuadrículas. Horizontalmente van de la A-E, verticalmente del 1-5.
  - Al finalizar la búsqueda, los embriones se pasan a los platos de mantenimiento.
4. Clasificación de embriones.
  - Clasificar los embriones en grados, en una escala de 1 a 4, siendo el grado 1 el de mejor calidad y grado 4 de calidad degenerado (células degeneradas).



5. Mantenimiento de embriones (Holding) a 37°C.
  - Usar platos de mantenimiento, el cual contiene 5 pasos en forma circular y uno al centro.
  - Usar solución que contiene 10% de SFB, diferente al medio de colecta el cual tiene 1% de SFB.
  - Método de limpieza o mantenimiento de los embriones: 5 holding o limpieza, 2 de tripsina para eliminar cualquier agente contaminante o infeccioso (30-60 seg. cada paso, con mas tiempo en la tripsina el embrión se empieza a degradar), 5 holding para quitar la tripsina y dejar alrededor del embrión estéril.
  - Pasar los embriones buenos (grados 1 y 2) en solución de etilenglicol o glicerol por 5-7 min.
  
6. Llenado de las pajillas.
  - Usar jeringas de 1 mL desechables para llenar pajillas.
  - Primero llenar la pajilla con etilenglicol, luego dejar un espacio de aire, seguido de etilenglicol o glicerol con el embrión (el embrión queda en la parte media de la pajilla), llenar de nuevo un espacio de aire y por último llenar con etilenglicol o glicerol.
  - El espacio de aire sirve de ayuda al momento cuando se transfiere el embrión a que no quede adherido en la pajilla o en la punta de la pajilla y salga todo el contenido.
  
7. Sellado de las pajillas.
  - El sellado debe hacerse del extremo de la pajilla donde no se encuentra el algodón dentro.
  - Para sellar se hace con una máquina selladora con calor.
  
8. Preparación del equipo de congelamiento.
  - El equipo utilizado (BioCool) debe estar como punto de inicio a -0.6°C y un punto final de -34.0°C a un descenso de -0.53°C por minuto.
  - La solución utilizada para el congelamiento es alcohol etílico al 70%.
  
9. Cristalización.
  - Colocar las pajillas en el equipo a -0.60°C.
  - Colocar una barra de cobre en nitrógeno líquido a -196°C.
  - Pasar la barra de cobre sobre las pajillas haciendo un roce para que la solución dentro de la pajilla cristalice.
  - Dejar las pajillas por 10 minutos a -0.60°C en el equipo.
  - Comenzar con el descenso de temperatura a -0.53°C por minuto.
  
10. Etiquetar las pajillas con su respectiva información.
  - Esto se hace durante la cristalización de las pajillas.
  - La máquina que se utiliza es un aparato de etiquetado electrónico P-Touch.

- Introducir los datos del número de registro del laboratorio, tipo de medio que se utiliza para congelar el embrión, la raza del embrión, nombre y raza de la madre, nombre y raza del padre, calidad del embrión, fecha de colecta y congelamiento.
- Al terminar de introducir los datos, las etiquetas se colocan en las pajillas.

11. Pasar las pajillas al tanque de congelamiento con nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### **Descongelado de los embriones**

Según Hincapié *et al.* (2003) la descongelación se debe de hacer lo más rápido posible en agua a  $37^{\circ}\text{C}$ . Cuando los embriones son criopreservados en un mismo medio, el agente crioprotector (glicerol) debe ser removido de las células del embrión, esto se logra lavando 4 ó 6 veces sucesivas en soluciones de concentración decreciente del crioprotector. Luego se hace una evaluación de los embriones, los que son aptos para la transferencia se colocan en pajillas de 0.5 ó 0.25 mL y se transfieren directamente. Otra técnica sencilla es utilizando moléculas de sacarosa ya que ésta no penetra las células y permite la eliminación del crioprotector de un solo paso. Cuando se utiliza etilenglicol la transferencia del embrión se hace directa.

## **LABORATORIO DE FERTILIZACIÓN *in vitro***

### **Aspiraciones de oocitos**

#### **Preparación del equipo**

-Mesa de instalación del equipo. Debe estar limpia y ordenada. Al momento de hacer la limpieza, también se debe hacer una desinfección con una solución de agua y clorhexidina. Se debe hacer lo mismo al finalizar.

-Baño María. Preparar el baño María 10 minutos antes de iniciar el trabajo, cambiar el agua, de ser posible usar agua destilada y luego ubicarlo sobre la mesa de instalación. Asegurarse de que esté a una temperatura de 37°C. En el baño María se colocan los tubos de ensayo, en los cuales se almacenan los oocitos.

-Ecógrafo. Comprobar que esté bien instalado y la imagen sea la que mejor se adecue a la vista de quien lo está utilizando.

-Sonda de aspiración. Debe estar limpia y desinfectada. Al terminar de aspirar las vacas se debe desarmar y lavar con una solución de agua y clorhexidina, luego dejarlo en un ambiente fresco y seco. Al iniciar el trabajo conectar la sonda al ecógrafo, verificar que este bien conectado.

-Bomba de vacío. Asegurarse de que este limpia, luego conectar la salida de succión a través de una manguera al tubo de ensayo, en el cual se almacena 5 mL de medio de mantenimiento de los oocitos, este se mantiene dentro del baño María, para asegurar que los oocitos no sufran ningún estrés térmico. El tubo de ensayo también tiene una salida con una manguera hacia la sonda de aspiración, esta se conecta a una varilla de metal que va interna en la sonda y la varilla tiene en el otro extremo la aguja de aspiración, la que succiona los oocitos.

-Pedal de la bomba de succión. Cuando se presiona, la bomba de vacío crea la presión negativa de succión, esta presión es alrededor de 89 psi.

#### **Procedimientos para la aspiración de oocitos**

Asegurarse que los demás materiales no falten sobre la mesa de instalación: guantes de palpación, papel de limpieza, gel, agujas de aspiración, camisas de protección de la sonda, lidocaína, tubos de ensayo con medio de mantenimiento y tubos de ensayo con medios de lavado, jeringas y agujas para lidocaína y medio de lavado y un marcador para escribir la información necesaria en la tapa del tubo de ensayo y facilitar el trabajo en el

laboratorio. Para vacas muy nerviosas se utilizan dosis de 0.5 o 1 mL de acepromacine como tranquilizante.

Después que está todo el equipo instalado, se coloca la vaca en la prensa y se asegura que este tranquila. Se aplica la Lidocaína al 2% (anestésico local) utilizando la técnica de anestesia epidural sacro-coccígea para evitar las contracciones del recto de la vaca y facilitar al manipulación de los ovarios al momento de hacer la aspiración, también evita que la vaca sienta algún dolor al momento de perforar con la aguja de aspiración. Una vez que se aplicó la lidocaína, se hace una evacuación de las heces presentes en el recto, seguido de un lavado de la vulva con agua y se seca. Después se procede a introducir la sonda de aspiración por el tracto genital de la vaca, con camisa de protección, aguja de aspiración y un poco de gel lubricante.

La técnica de aspiraciones de oocitos consiste en aprovechar las ondas de crecimiento folicular dentro del ciclo estral, obtener un número grande de oocitos, ponerlos a madurar y hacerles la fertilización *in vitro*.

Todos los folículos en crecimiento se encuentran en la periferia del ovario, por lo tanto al momento de ejecutar la aspiración, la aguja de aspiración se mueve con mucho cuidado sobre la parte superficial del ovario, y así evitar introducir la aguja en el cuerpo del ovario, lo cual puede causar lesiones, hemorragias e infecciones.

Los oocitos junto con el líquido folicular son succionados por la aguja de aspiración, hasta llegar al tubo de ensayo que se encuentra dentro del baño María. Finalizada la aspiración que puede durar de 20 a 30 minutos, sobre la tapa del tubo de ensayo se escribe el número de la vaca que se trabajó y se pasa al laboratorio de fertilización *in vitro*.

Una vez terminado el proceso de aspiración, en el tubo de ensayo queda un líquido rojo, este color se debe a la mezcla de sangre y el medio de mantenimiento utilizado para drenar los oocitos y hacerlos llegar hasta el tubo de ensayo. Luego este es llevado al laboratorio de fertilización *in vitro* donde continúa el proceso de búsqueda, maduración y fertilización de los oocitos, posteriormente el congelado de los embriones.

### **Búsqueda de oocitos**

Todo el líquido que se encuentra en el tubo de ensayo es pasado por un filtro igual al que se usa para los embriones, se enjuaga muy bien el tubo de ensayo con PBS (Phosphate Buffered Saline por sus siglas en inglés), luego el filtro se enjuaga dos o tres veces hasta eliminar el color rojizo de la sangre. El líquido que queda en el filtro se pasa a un plato de búsqueda y se procede a buscar los oocitos.

Todos los oocitos encontrados, continúan por tres pasos importantes del proceso: maduración, fertilización de los oocitos maduros y cultivo de embriones. Estos son puntos críticos de control, ya que únicamente del 25% al 40% de todos los oocitos, alcanzan el estadio de Blastocito (B) o Blastocito expandido (Bex) que son los estados viables de un embrión.

## **Maduración**

En esta fase del proceso se trata de simular lo que ocurre en las trompas de Falopio, después de la ovulación.

Se sabe que fueron aspirados todos los folículos en crecimiento, los cuales estaban compitiendo por la dominancia para terminar en una ovulación. Según Moreno (2004), los oocitos presentes en estos folículos se encuentran en un estado llamado diakinesis, es decir se mantienen estáticos. Estos han estado así desde el momento del nacimiento de la ternera, debido a que la capa de células llamada corona radiata que rodea la zona pelúcida del ovocito, produce un inhibidor de maduración. De manera natural este efecto es cortado por acción de la LH en la ovulación, donde el ovocito pierde contacto con el inhibidor, y empieza su proceso de maduración.

Cuando los oocitos llegan al laboratorio de FIV, ya no se encuentran estáticos, sino en un estado de maduración, el cual consiste en una serie de etapas de división celular es por eso que son puestos en medio energético y proteico para óptimo desarrollo.

Según Hafez (1996), la naturaleza de la maduración folicular (inducida o natural), el diámetro del folículo del que se origina el oocito y la fuente de líquido folicular (cantidad), no afectan el proceso de maduración de los oocitos, que es independiente de todos estos parámetros.

De acuerdo a Moreno (2004), durante la maduración hay un crecimiento de los oocitos, a través de 2 divisiones meióticas. Los oocitos inmaduros tienen un núcleo grande llamado vesícula germinal, la primera división meiótica se inicia con la Metafase I desde el estado de vesícula germinal y avanza hasta la Telofase I donde se da la formación del primer cuerpo polar, en estado natural esta parte del proceso de maduración ocurre dentro del folículo, simultáneamente a la maduración del núcleo ocurre la maduración del citoplasma, se puede decir que en este momento el ovocito se encuentra bien definido, la zona pelúcida, el espacio perivitelino y el material genético presente en los cromosomas están preparados a recibir el espermatozoide para producir la fecundación. La segunda división meiótica inicia con la Metafase II y se produce la ovulación, para que en la Anafase II suceda la fecundación y la adición del material genético, en la Telofase II se da la formación del segundo cuerpo polar. Esta segunda división meiótica se produce en el primer tercio del oviducto. Una vez formado el segundo cuerpo polar, inicia la primera división mitótica.

En el laboratorio de FIV los oocitos son puestos a madurar durante 24 horas en la cámara de maduración, a una temperatura de 37°C en un medio energético. Después son cambiados de medio y se agrega el semen del toro que se va a utilizar para la cruce, pasan a la cámara de incubación durante seis días. Luego de este tiempo se eligen los estados de mórula, blastocito y blastocito expandido que están en excelentes condiciones, todos los embriones degenerados o malos son descartados.

### **Fertilización o fecundación**

La maduración y la meiosis del óvulo no se completan si no hasta después de la fecundación, cuando el óvulo se convierte en un cigoto (Hafez 1996).

Según Moreno (2004), para que tenga lugar la fecundación los espermatozoides deben pasar por el proceso de capacitación, el cual les permite liberarse de sustancias que les impida atravesar las células de cumulus y la zona pelúcida. Solo un espermatozoide es capaz de hacerlo, gracias a la secreción de hyaluronidasa. Instantáneamente que este lo logra, se da la reacción de zona y se evita la poliespermia.

### **Medios de cultivo**

Según Castro (2007)<sup>8</sup> en el proceso de FIV los embriones pueden ser mas afectados por factores abióticos que por factores bióticos, por lo tanto hay que considerar este punto al momento de elegir el medio de cultivo con el que se va a trabajar.

Los componentes abióticos evaluados en un medio de cultivo son (Mucci *et al* 2006):

**Osmolaridad:** Es la capacidad que tienen los embriones de absorber agua del medio en que se encuentran para lograr el punto de equilibrio entre las sustancias disueltas en el medio y las presentes en el embrión. Esto induce en una estabilización de la presión osmótica.

**pH:** Los embriones se desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino.

**CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>:** Los porcentajes de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> deben ser similares a los encontrados en el oviducto de algunas vacas. Los mas utilizados son 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, para una excelente maduración y fecundación de los oocitos, y también para un buen desarrollo embrionario.

**Relación del Na y el K:** Se necesitan niveles bajos de Na y altos de K, en comparación con los niveles plasmáticos.

**Agua:** Es el elemento de mayor proporción en un medio de cultivo y su pureza esta altamente relacionada con el desarrollo embrionario. Algunos medios utilizan agua bidestilada, para reducir las posibilidades de que resulten problemas con metales pesados encontrados en mayor proporción en el agua utilizada.

### **Empajillado**

Una vez elegidos los embriones que se van a congelar, se empajuelan de la misma manera como se hace con los embriones obtenidos del cultivo *in-vivo*.

También los procesos de congelado y etiquetados siguen los mismos pasos usados con los embriones del cultivo *in-vivo*.

---

<sup>8</sup> Castro, A. 2007. Entrevista: Medios de cultivo. Genetic Resources International and Sexing Technologies, EUA.

En GRI todos estos pasos son realizados en un área específica donde hay acceso únicamente para las dos personas que trabajan en ello, esto es parte de la seguridad del embrión, por que elimina los riesgos de una contaminación.

## **HIGIENE Y SEGURIDAD**

En el laboratorio de embriones y fertilización *in vitro* se deben seguir procedimientos de higiene para no afectar los procesos y contaminación tanto del producto como de los empleados.

Los equipos dentro del laboratorio deben ser lavados, desinfectados y esterilizados después de cada proceso; el manejo de medicinas debe estar en un lugar seco y limpio y los medicamentos que necesitan refrigeración a una temperatura de 4-10°C aproximadamente.

Las agujas después de cada aplicación son desechadas en un envase de bioseguridad, para evitar contaminación y daños a los empleados al momento de manejar desechos.

El área de laboratorio debe estar limpia y ordenada todos los días para evitar daños.

- En ambos laboratorios solo se permitirá el ingreso al personal encargado y el supervisor.
- No deben ingresar personas de otra finca u otros empleados del área de campo.
- Se debe manejar adecuadamente el control de plagas dentro de los laboratorios.

De la empresa GRI se analizaron los siguientes puntos:

### **Uso adecuado del material y equipo para efectuar los procesos**

Vacas donadoras

- Uso adecuado del uniforme de los empleados.
- Ofrecer alimento en buen estado.
- Revisar el consumo de sales minerales semanalmente.
- Aplicación de las hormonas, vitaminas y desparasitantes en el momento y lugar adecuado.
- Detección de celo visual.
- Efectuar bien el proceso de incorporación de implantes hormonales (CIDR®).
- Manipulación adecuada del equipo de aspiración de oocitos.
- Manipulación de las pistolas de I.A.
- En el caso de detección de celo por medio de un aparato electrónico (HeatWatch), colocar bien los parches con su debido transmisor.
- Colocar los aretes de identificación a las vacas recién ingresadas.



#### Vacas receptoras

- Colocar los aretes de identificación a las vacas recién ingresadas y transferidas con embrión con su respectiva información.
- Aplicación de vitaminas y desparasitantes en el momento y lugar adecuado.
- Manejo adecuado del Hotshot (para acarreo de las vacas) tanto en el corral como en la manga.
- Ofrecer alimento en buen estado.
- Manipulación de las pistolas de T.E.

#### Laboratorio de T.E.

- Manipulación adecuada del equipo de aislamiento de embriones.
- Almacenamiento de los materiales del laboratorio.
- Manipulación del tanque de almacenamiento de semen y embriones.

#### Laboratorio de fertilización *in vitro*

- Utilizar las soluciones adecuadas para el cultivo de los embriones.
- Uso adecuado del equipo de manipulación de oocitos.
- Uniforme adecuado para el laboratorio.

### **Medidas de control de calidad y producción: Puntos críticos de control y riesgos**

#### Vacas donadoras

- Detección de celo.
- Calidad y estado del alimento.
- Temperatura al momento de aspirar oocitos.
- Limpieza del área de trabajo (manga y prensa).
- Manejo de las vacas en la pastura, corral, manga y prensa.
- Uso adecuado de los programas de superovulación.
- Usar los programas de sincronización y superovulación adecuado a la raza, edad y estado nutricional de las vacas.

#### Vacas receptoras

- Selección de la vaca en sí como una receptora potencial. Evaluar cruce y el estado del tracto reproductivo (cérvix).
- Manejo adecuado de las pasturas, el corral, la manga y la prensa para evitar el estrés.
- Colocar adecuadamente los implantes (CIDR<sup>®</sup>).
- Evaluación del cuerpo lúteo para la transferencia de embriones.
- Implantar el embrión en el cuerno uterino adecuado.
- Control calendarizado de las vacas que están en sincronización.

#### Laboratorio de transferencia de embriones

- Lavado del filtro.
- Búsqueda y clasificado de embriones.
- Respectiva identificación de cada embrión.
- Congelado de embriones.

- Descongelado de embriones.
- Restricción a personas no autorizadas en el laboratorio.
- Limpieza total del área. Evitar entrar con las botas sucias.
- Uso adecuado de los medios de lavado y manipulación de embriones en el tiempo estipulado.
- Uso adecuado del uniforme de trabajo.

#### Laboratorio de fertilización *in vitro*.

- Usar el uniforme de trabajo completo.
- Permitir la entrada únicamente al personal autorizado.
- Lavado adecuado del filtro.
- Búsqueda de oocitos.
- Limpieza diaria del laboratorio.
- Desinfección de materiales y equipos.
- Manejo de desechos (basura).
- Empajillado, identificación de la pajueta y congelado de los embriones.

### **Control y manejo de residuos**

#### Vacas donadoras y receptoras

- Manejo de frascos de medicamentos separados de la demás basura.
- Manejo de reciclaje, manteniendo vidrios, plásticos, metal, papel por separado.
- Objetos cortos punzantes deben ser manejados en un recipiente para uso de seguridad del personal.
- El estiércol debe ser utilizado como fertilizante orgánico de la finca.
- Manejo y construcción adecuado de fosas de aguas residuales para evitar contaminación de la finca.

#### Laboratorio de T.E. y fertilización *in vitro*

- Manejo diario de la basura para evitar contaminación.
- Medicamentos vencidos y en mal estado se debe tomar medidas preventivas.
- Uso de reciclaje de basura.

## **CONCLUSIONES**

- Un manual de procedimientos permite el seguimiento continuo de las normas de operación que se llevan a cabo dentro de las instalaciones de una empresa.
- Las normas de calidad y producción dentro de la empresa hacen que los resultados sean de éxito y mejoramiento continuo.

## RECOMENDACIONES

- Revisar semanalmente la disponibilidad de sales minerales y establecer un día específico para realizar dicha actividad.
- Evitar la pudrición de los rollos de heno y alfalfa; hacer una galera para que estén bajo techo y no se mojen.
- Hacer una pequeña sala de maternidad.
- Ampliar el sistema de drenaje del área común de trabajo (manga y prensa), evitar tirar residuos como tubos de ensayo, guantes de palpación, sondas, jeringas o cualquier objeto que pueda tapar el sistema de drenaje.
- Darle un manejo a los desechos sólidos para evitar contaminación.
- Sellar o cerrar el área de trabajo donde se encuentra la manga y la prensa, para evitar problemas al momento de aspirar oocitos, ya que en tiempos de baja temperatura ambiental estos sufren choques térmicos lo cual se puede solucionar colocando un sistema de calefacción.
- La persona encargada del área de campo debe utilizar el uniforme completo, botas de hule y overol.
- Contratar por lo menos dos personas, una para el área de campo y otra para ayudar en el laboratorio de embriones.
- La persona que trabaje en el laboratorio de fertilización *in vitro*, debe usar el uniforme completo: Gabacha, guantes, redecillas y mascarillas.
- Cada vez que se hacen movimientos de vacas de una pastura a otra, hacer el respectivo movimiento de las fichas en el tablero de control de inventario.

## LITERATURA CITADA

ABS. 2006. A.I. Management Manual. Fifth Edition. Volume 2. Wisconsin, USA.

Becaluba, F. 2007. Factores que afectan la superovulación en bovinos (en línea). Consultado el 23 de septiembre del 2007. Disponible en: [http://www.engormix.com/factores\\_afectan\\_superovulacion\\_bovinos\\_articulos\\_1684\\_GD\\_C.htm](http://www.engormix.com/factores_afectan_superovulacion_bovinos_articulos_1684_GD_C.htm)

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

Di-Bella, V. s.f. Utilización práctica de transferencia de embriones en México: Principales inquietudes de criadores y respuestas técnicas (en línea). Consultado el 7 de mayo del 2007. Disponible en: [http://www.engormix.com/utilizacion\\_practica\\_transferencia\\_embryones\\_s\\_articulos\\_561\\_GDC.htm](http://www.engormix.com/utilizacion_practica_transferencia_embryones_s_articulos_561_GDC.htm)

Fricke, P. sf. Aplicaciones prácticas del ultrasonido para el manejo reproductivo en ganado lechero (en línea). Consultado el 2 de septiembre del 2007. Disponible en: [http://www.wisc.edu/dysci/uwex/rep\\_phys/pubs/ultrasound502-spanish.pdf](http://www.wisc.edu/dysci/uwex/rep_phys/pubs/ultrasound502-spanish.pdf)

González Fernández, R. 2001. Procedimientos en los programas de transplante de embriones en ganado bovino. En: *Reproducción Bovina*. C. González-Stagnaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXV: 391-409.

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

Gordon, I. 2004. *Tecnología de la reproducción de animales de granja*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. 441 p.

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

Hafez, E. 1996. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Interamericana McGRAW-HILL. 6a. ed. 542 p.

- Hincapié, J. 2004. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Ed. Litocom. Tegucigalpa, Honduras. 167 p.
- Hincapié, J.; Capallejas, R.; Pipaon, E. 2003. Reproducción animal aplicada: Fundamentos de fisiología y biotecnología. Ed. Litocom. Tegucigalpa, Honduras. 233 p.
- Illera, M. 1994. Reproducción de los animales domésticos. Ed. AEDOS. Madrid, España. 390 p.
- Moreno, J. 2004. Transferencia de embriones en bovinos. Texas, EUA. 97p.
- Mucci, N.; Aller, J.; Kaiser, G.; Hozbor, F. 2006. Produccion *in vitro* de embriones bovinos: Suplementacion de los medios de cultivo con suero. Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Balcare, Argentina (en línea). Consultado el 10 de septiembre del 2007. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos904/in-vitro-bovinos/in-vitro-bovinos.shtml>
- Palma, G.; Brem, G. 1993. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 503 p.
- Phillips, C. 2003. Principios de producción bovina. Zaragoza, España. Ed. Acribia S.A. 341 p.
- Putney, D.; Drost, M.; Tatcher, W. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 pos insemination. Theriogenology 30: 195-209.
- Robertson, E. 2002. Non-Surgical Embryo Transfer. 8<sup>th</sup> Edition. Harrogate Genetics International, Inc. Tennessee, USA. 33 p.
- Rodríguez, C.F.M. 1988. Qualitative and quantitative evaluation of embryo transfer in cattle. I. Performance of zebu and *Bos taurus* cattle. Revista do centro de ciencias rurar 18 (suppl.), 373.
- Taylor, R.; Field, T. 2001. Scientific farms animal production: An introduction to animal science. Seventh Edition. Colorado State University. USA. 744 p.
- Wikipedia. 2007. Osmolaridad (en línea). Consultado el 2 de septiembre del 2007. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Osmolaridad>.

## ANEXOS

Listado de materiales y medicamentos utilizados en la T.E y fertilización *in vitro* en GRI.

Anexo1. Medicamentos, implantes y hormonas utilizadas.

Lidocaína 2%



Prostamate: PGF<sub>2α</sub>



Benzoato de Estradiol



Folltropin-v: FSH



Acepromacine



Clorhexideina



Estrumate: PGF<sub>2α</sub>



CIDR



## Anexo 2. Colecta de embriones.

Sonda de lavado



Medio de lavado



Filtro



Conector Y



Demostración del inflado del balón

Anexo 3. Laboratorio de T.E. y fertilización *in vitro*.

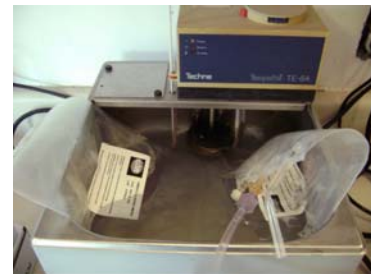
Microscopio



Estereoscopio



Baño maría



Placa calefactor o termostato



Jeringuillas de 1 mL

