

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN Y
COMERCIALIZACIÓN AGROPECUARIA



TESIS DE GRADO

**EFFECTO DE LA HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA EQUINA
(eCG) EN LA RESPUESTA OVARICA Y LA PRODUCCIÓN DE
EMBRIONES EN OVINOS (*Ovis aries*) EN LA ESTACIÓN
EXPERIMENTAL CHOQUENAIRA**

POSTULANTE:

MAMERTO SILVESTRE VILLCA

La Paz – Bolivia

2020

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARRERA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN AGROPECUARIA

EFFECTO DE LA HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA EQUINA (eCG) EN LA RESPUESTA OVÁRICA Y LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN OVINOS (*Ovis aries*) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHOQUENAIRA

Tesis de Grado Presentado como requisito parcial
para optar el Título de Ingeniero en producción y
comercialización agropecuaria

MAMERTO SILVESTRE VILLCA

Tutor (es)

MVZ. MSc. Rene Condori Ediles


Ing. MSc. Rolando Cesar Paxipati Peña


Ing. Eloy Hernán Huacani Rivera


Tribunal revisor

Ing. Rubén Tallacagua Terrazas


Ing. MSc. Daniel Severo Choque Sánchez


Ing. MSc. Juan José Vicente Rojas


Aprobado

Presidente Tribunal Examinador.....


DEDICATORIA:

A Dios, por darme fuerza para ser perseverante en mis metas trazadas.

A mis seres queridos, mi padre Benedicto Silvestre Ticona y mi madre Andrea Villca Mamani por darme la vida y la razón de ser, porque siempre me orientaron y guiaron mi camino, con todo su amor confianza y apoyo que me brindaron.

A mis queridos hermanos: Amalia, Encarnación, Crecencia, Mariola, Maritza, Justo. Quienes me apoyaron en la culminación de esta etapa de mi vida y mi formación profesional durante los 5 años de mi carrera.

A todos mis amigos que fueron mi apoyo moral, mi fuerza y mi aliento en todo momento de la carrera, que, con sus alegrías y nostalgias compartidas, recuerdos gratos que forman hoy parte importante de mi vida. A todos ellos mil gracias. Nada hubiera sido lo mismo sin ustedes. Siempre los llevare en mis pensamientos queridos compañeros de CIPyCA.

Dios los bendiga a todos.

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a Dios por la oportunidad de concederme la vida, por ser luz que ilumino mi camino, durante mi formación profesional.

A la Universidad Mayor de San Andrés y a la Carrera Ingeniería en Producción y Comercialización Agropecuaria, por haberme acogido durante mi formación académica.

A la Estación Experimental Choquenaira por brindarme sus ambientes necesarios para la realización mi investigación (tesis).

A mis tutores MVZ. MSc. Rene Condori Equice, Ing. MSc. Rolando Cesar Paxipati Parra y Ing. Eloy Hernán Huacani Rivera, Tec.Sup.Agr. Eulogio Kantuta Serrano por su colaboración y apoyo incondicional, por brindarme orientación, consejos, sugerencias y aporte en la ejecución de mi investigación, gracias por confiar en mí.

A mis tribunales Ing. Rubén Tallacagua Terrazas, Ing. MSc. Daniel Severo Choque Sánchez y Ing. MSc. Juan José Vicente Rojas, por guiarme y corregirme en la presente investigación.

A mis compañeros de la Carrera de Ingeniería en Producción y Comercialización Agropecuaria, que siempre me brindaron su apoyo moral y por los momentos compartidos en especial a: Álvaro Mamani Esquía, Hernán Quispe Huarachi.

Finalmente, a todas las personas que de una u otra manera fueron parte en la orientación y elaboración de la presente investigación.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA:.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS.....	ix
RESUMEN	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos	2
1.3.1. Objetivo general	2
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
1.4. Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Situación del ganado ovino en Bolivia	4
2.2. Anatomía del aparato reproductor de la hembra	4
2.2.1. Ovario.....	4
2.2.2. Oviducto	5
2.2.3. Cuernos del útero	5
2.2.4. Cuerpo del útero.....	6
2.2.5. Cérvix	6
2.2.6. Vagina	7
2.2.7. Vulva	7
2.3. Fisiología reproductiva de la hembra	7

2.3.1. Ciclo estral.....	7
2.3.1.1. Proestro.....	8
2.3.1.2. Estro.....	8
2.3.1.3. Metaestro.....	9
2.3.1.4. Diestro.....	9
2.3.3. Endocrinología del ciclo estral.....	9
2.4. Métodos de sincronización del estro.....	12
2.4.1. Sincronización utilizando progestágenos.....	12
2.4.2. Sincronización utilizando PGF-2 α	13
2.5. Tratamiento de estimulación ovárica.....	13
2.5.1. Selección de Donadoras y Receptoras.....	15
2.5.2. Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple.....	16
2.5.3. Colecta de embriones.....	17
2.5.3.1. Técnica quirúrgica.....	18
2.5.3.2. Técnica no quirúrgica.....	19
2.6. Evaluación y clasificación de embriones.....	20
2.6.1. Grados de clasificación de embriones.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Localización.....	23
3.2. Materiales.....	24
3.2.1. Materiales biológicos.....	24
3.2.2. Materiales para superovulación.....	24
3.2.3. Medicamentos medios y hormonas.....	25
3.2.4. Equipos.....	25
3.2.5. Desparasitantes y vitaminas.....	26
3.3. Métodos.....	26
3.3.1. Selección de ovinos donadoras de embriones.....	26
3.3.2. Etapa de Vitaminización y desparasitación.....	26
3.3.3. Alimentación bajo sistema Flushing de los ovinos donadoras.....	26
3.3.4. Sincronización de estro y tratamiento de Superovulación de ovejas donadoras..	27

3.3.4.1. Procedimiento para colocación de esponja intravaginal.....	28
3.3.5. Etapa de empadres de ovejas donadoras	28
3.3.6. Preparación del ambiente y materiales para el lavado de embriones	28
3.3.7. Preparación de las donadoras para el lavado de embriones.....	29
3.3.8. Etapa de colección de embriones	29
3.3.9. Manipulación de embriones.....	31
3.3.10. Búsqueda y conteo del número de embriones	31
3.3.11. Evaluación de la calidad morfológica de los embriones	31
3.4. Factor de estudio.....	32
3.5. Variables de respuesta.....	32
3.6. Análisis estadístico	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. Resultados del conteo de cuerpos lúteos.....	34
4.2. Determinación del número de cuerpos lúteos a efecto de Superovulación con 800 y 1000 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) en ovinos	35
5. CONCLUSIONES.....	44
6. RECOMENDACIONES	45
7. BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	49

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1 Conteo de cuerpos lúteos.....	34
Cuadro 3 Número de cuerpos lúteos observados mediante laparotomía.....	35
Tabla 2 Colecta de embriones a efecto de (eCG).	39
Cuadro 4. Embriones obtenidos mediante lavado uterino, y clasificación.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de cuerpos lúteos en ovinos donadoras a base de 1000 UI eCG.....	36
Figura 2. Numero de cuerpos lúteos en ovinos donadoras a base de 800 UI eCG.....	36
5.3. Determinación del número y calidad de embriones a efecto de Superovulación con 800 y 1000 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) en ovinos.....	40
Figura 3. Producción de embriones por donadora a base de 1000 UI eCG.....	42
Figura 4. Producción de embriones por donadora a base de 800 UI eCG.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Ovinos donadoras	2
Anexo 2 Preparación de hormona (eCG)	3
Anexo 3 Administración de la hormona eCG	3
Anexo 4 Tricotomía parte abdomen de ovinos donadoras	4
Anexo 5 Camilla reclinable	4
Anexo 6 Preparación de materiales de cirugía	5
Anexo 7 Extracción de cuernos uterinos para lavado y colecta de embriones	6
Anexo 8 Conteo de número de cuerpos lúteos.....	6
Anexo 9 Proceso de colección de embriones.....	6
Anexo 10 Búsqueda de embriones en el estereoscopio.....	7
Anexo 11 Embriones colectados	8
Anexo 12 Clasificación de embriones.....	8
Anexo 13 Costos	9

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en meses de marzo a septiembre en la Estación Experimental Choquenaira Provincia Ingavi del Departamento de La Paz que está a una altura de 3870 m.s.n.m.; con el objetivo de evaluar el efecto de la Hormona Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) para la producción de embriones en ovinos donadoras, con un protocolo de Superovulación, para lo cual se utilizó 8 ovinos donadoras de 4 años de edad, tratamiento 1. Se sincronizo a 4 ovinos donadoras con la esponja intravaginal con progestágeno posteriormente se aplicó 800 UI de (eCG) por vía intramuscular, cumpliendo el protocolo de Superovulación se realizó la colecta, el lavado y clasificación de embriones. Tratamiento 2. Se sincronizo a 4 ovinos donadoras con la esponja intravaginal con progestágeno posteriormente se aplicó 1000 UI de (eCG) por vía intramuscular, cumpliendo el protocolo de Superovulación se realizó la colecta, el lavado y clasificación de embriones. En cuanto a los resultado. El promedio de embriones obtenidos (figura 2) en el tratamiento 1 fue 2.25 ± 0.96 embriones por donadora. En el tratamiento 2 el número de embriones fue 1.25 ± 0.96 . A nivel de 5% dado que $P = 0.1901$ es mayor a nivel alfa 0.05, se concluye que no existieron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el promedio de embriones del T1 y el T2. Con estos resultados se acepta la hipótesis nula demostrando que los animales del T1 tienen igual respuesta ovulatoria que los animales del T2.

Para el T2 con un promedio de 1.25 ± 0.96 embriones obtenidos por oveja es similar frente al promedio reportado por Blanco et al. (2003) donde obtuvo un promedio de 1.0 ± 0.5 embriones por oveja y para el T2 el resultado 2.25 ± 0.96 embriones obtenidos por oveja es superior frente a 1.2 ± 0.6 embriones por oveja reportado por Blanco et al. (2003) a pesar de tener una dosis menor para la estimulación.

SUMMARY

This research was carried out in the months of March to September at the Choquenaira Province Ingavi Experimental Station of the Department of La Paz, which is at a height of 3870 m.s.n.m .; with the objective of evaluation the effect of Equine Chorionic Gonadotropin Hormone (eCG) for the production of embryos in donor sheep, with a Superovulation protocol, for which 8 donor sheep of 4 years of age are used, treatment 1. Synchronized to 4 donor sheep with the intravaginal sponge with posterior progestin, 800 IU of (eCG) is applied intramuscularly, complying with the superovulation protocol, collection, washing and embryo classification is performed. Treatment 2. It is synchronized to 4 donated sheep with the intravaginal sponge with progestogen subsequently 1000 IU of (eCG) is applied intramuscularly, complying with the superovulation protocol is carried out the collection, washing and classification of embryos. Regarding the results, the average fast embryos (table 2) in treatment 1 was 2.25 ± 0.96 embryos per donor. In treatment 2 the number of embryos was 1.25 ± 0.96 . A level of 5% given that $P = 0.1901$ is higher at the 0.05 alpha level, it is concluded that there is no significant difference ($p > 0.05$) between the average embryos of T1 and T2. With these results, the null hypothesis is accepted demonstrating that T1 animals have the same ovulatory response as T2 animals.

For T2 with an average of 1.25 ± 0.96 embryos recommended by sheep is similar to the average reported by Blanco et al. (2003) where it obtained an average of 1.0 ± 0.5 embryos per sheep and for T2 the result 2.25 ± 0.96 embryos obtained per sheep is higher compared to 1.2 ± 0.6 embryos per sheep reported by Blanco et al. (2003) despite having a lower dose for stimulation.

1. INTRODUCCIÓN

La ganadería ovina adquiere importancia en la zona altiplánica, porque gran parte de la población que se habita en altiplano, asume esta actividad por la vocación natural. La crianza de ovinos está básicamente desarrollado por pequeños productores a nivel comunal, con sus particularidades propias en cada región. Este rubro cumple roles muy importantes en la alimentación, vestimenta y en la generación de ingresos económicos. La capacidad de reproducción bajo sistemas tradicionales en las diferentes especies y razas es un factor limitante para acelerar el progreso genético. En condiciones normales la crianza de ovinos, se obtiene durante toda la vida productiva de una oveja entre 6 a 8 crías; la transferencia de embriones permite incrementar el potencial reproductivo de las hembras de alto valor genético mediante un mayor aprovechamiento de la reserva de ovocitos que se encuentran en el ovario que mediante estimulación hormonal desencadena una ovulación múltiple (OM) pudiéndose obtener un número considerable de embriones en un corto período de tiempo. (Gibbons & Cueto, 2013)

La Superovulación permite la multiplicación de hembra genéticamente superiores a tasas mayores que las naturales, utilizadas en diferente especies de interés zootécnico, en algunos países, la explotación ovina ha presentado históricamente un rubro importante dentro de las producciones agropecuarias, el estudio la posibilidad de emplear protocolos sencillos de estimulación apropiados para estos rebaños extensivos, sin afectar la producción de embriones e incluso reduciendo el costo. (Alonso, 2004)

1.1. Planteamiento del problema

Uno de los problemas principales es la baja eficiencia reproductiva, y como consecuencia los bajos ingresos económicos para el sustento de las familias, a pesar de que los últimos años de nuestro país se está promoviendo el manejo reproductivo a través de la técnica de la inseminación artificial en ovinos, sigue siendo una dificultad difundir rápidamente el material genético de ejemplares de buena características.

El problema principal es los bajos recursos económicos que generan los ovinos criollos hoy en día, donde los pequeños productores quieren hacer desaparecer este animal criollo y seleccionar los animales mejores e ir mejorando la genética mediante muchos protocolos, porque esta técnica ha demostrado en otras especie que si se puede mejorar la calidad genética.

Por la baja calidad genética en el altiplano de los ovinos, expresado en la producción de los pequeños productores es necesario realizar este tipo de investigación para mejorar la rentabilidad y el ingreso económico para las familias que se dedican a este rubro.

1.2. Justificación

La hormona Gonadotropina Coriónica Equina (eCG), es una hormona que tiene acciones bilógicas similares a la actividad FSH (80%) y LH (20%) y tiene una larga vida media de 63 horas debido a su alto contenido de ácido siálico. Porque el tratamiento de ovulación múltiple utilizando eCG presenta ventajas al ser un tratamiento económico, puede administrarse en una sola dosis lo que evita el manejo excesivo que resulta ser un factor estresante para los animales. Se ve por conveniente estudiar el efecto de la aplicación de un tratamiento con eCG para la Superovulación de ovinos para demostrar que es factible la producción de embriones viables y con ello realizar en un futuro cercano la transferencia de embriones y así acortar el progreso genético en la crianza de ovinos criadas por las familias en las comunidades.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de la Hormona Gonadotropina Coriónica equina (eCG) en la Superovulación y la producción de embriones en ovinos (*Ovis aries*) en la Estación Experimental de Choquenaira.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar el número de cuerpos lúteos a efecto de Superovulación con 800 y 1000 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) en ovinos.
- Determinar el número y calidad de embriones a efecto de Superovulación con 800 y 1000 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) en ovinos.

1.4. Hipótesis

Ho. Los ovinos tratado con la dosis de 800 UI de eCG tienen la misma respuesta ovulatoria que los animales tratados con una dosis de 1000 UI de eCG.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Situación del ganado ovino en Bolivia

La población aproximada de ganado ovino en Bolivia es de 8,877.5100 cabezas, de las cuales el departamento de La Paz cuenta con 3,169.150 cabezas, distribuidas en el Altiplano Sur, Central y Norte. (INE, 2011)

En Bolivia el ganado ovino, en su mayoría es de la línea criolla (90%), se hallan distribuidos en ecosistemas donde, las condiciones ambientales son extremas (sequía, heladas). El manejo es realizado por pequeños productores, mediante tecnología tradicional, con resultados, nada expectables. (INE, 2011)

La ganadería ovina se constituye como el elemento estabilizador de la economía familiar y campesina, además de una articulación directa en la fertilización de los suelos (estiércol), en la utilización de artesanías textiles de reconocido valor. (Quiroga, 2005, pág. 157)

2.2. Anatomía del aparato reproductor de la hembra

2.2.1. Ovario

Son los órganos esenciales para la reproducción de la hembra, son glándulas de secreción endocrina (hormonas) y exocrina (gametos). Se sitúan en la cavidad abdominal en la parte anterior de la cavidad pélvica (Villca, 2013).

En términos generales, se encarga de organizar y dirigir toda la vida sexual de la hembra, regulando el ciclo estral con la liberación de hormonas y de un óvulo cada 17

días, en su superficie se encuentran 2 estructuras: los folículos y el cuerpo lúteo (CL), los primeros están llenos de fluidos y varían en tamaño el más grande se denomina “dominante” y es el que ovula cuando el animal entra en celo, por influencia de las hormonas gonadotropina FSH y LH. (Rojas, 2003)

En el espacio que queda después de la ovulación, se forma un cuerpo hemorrágico que luego se transforma en CL. Al momento de la palpación rectal, la detección del CL sirve para comprobar si ocurrió la fecundación, en caso contrario se degenera alrededor del día 14, los folículos produce los estrógenos, responsables de la conducta sexual durante el estro, mientras que el CL secreta progesterona, responsable de la inactividad sexual y del mantenimiento de la gestación. (Dowd, 1999)

2.2.2. Oviducto

El oviducto sostiene al ovario por medio de las fimbrias quienes se encargan de capturar al ovocito al momento de la ovulación; el ovocito avanza sobre el oviducto para encontrarse con los espermatozoides y poder ser fecundado, 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. (Hafez E. , 2000)

2.2.3. Cuernos del útero

El oviducto termina donde inicia el cuerno uterino, nueve días después el huevo fecundado ya es un embrión maduro y puede estar localizados en el cuerno derecho o izquierdo, dependiendo donde se produjo la ovulación, en el cuerno del útero se hace el reconocimiento del embrión, las paredes del cuerno reconocen el embrión y este es adherido a ella para dar origen al nuevo feto. (Hafez E. , 2000)

2.2.4. Cuerpo del útero

El cuerpo del útero es corto, mientras que los cuernos uterinos son relativamente largos, el embrión continua su desarrollo aquí y empieza la formación de la placenta, que lo cubre mientras se convierte en feto, la placenta proporciona nutrición y oxígeno al producto y le retira desechos y dióxido de carbono, no hay mezcla directa de sangre entre feto y la madre, pero un complejo sistema permite el paso selectivo de ciertas moléculas de un lado a otro. (Hafez E. , 2000)

2.2.5. Cérvix

Es una estructura con forma de esfínter con pliegues y criptas que tiene como principal función la de actuar como una barrera separando el útero que es una zona limpia de la vagina. Esta función es esencial para que una gestación se desarrolle sin problemas, la estructura más destacada son sus anillos que se encuentran apoyados sobre una potente lámina de fibras musculares lisas que permite que se contraiga o se relaje durante el estro para permitir el paso del semen en dirección al útero o la expulsión del feto durante el parto. (Hafez E. , 2000)

En la mucosa existen células secretoras de moco cervical, la cantidad y viscosidad de esta secreción depende del predominio de estrógenos o progesterona durante el ciclo estral, en la fase de estro el moco cervical es muy fluido para facilitar la ascensión de los espermatozoides, pero en cambio una vez que se ha producido la ovulación, debido a la progesterona, se transforma en una secreción muy viscosa.

Por último, el número de anillos es una particularidad de cada especie, así por ejemplo, la vaca posee tres anillos y en cambio la oveja posee al menos siete, lo que impide que en la práctica la inseminación cervical similar a la de la vaca tenga éxito. (Hafez E. , 2000)

2.2.6. Vagina

Villca (2003), menciona que es la porción del conducto del parto situada en la cavidad pelviana, entre el útero por delante y el vestíbulo caudalmente. Sirve como receptáculo para recibir el pene del macho durante la cópula.

La mucosa vaginal carece de glándulas, está formada de epitelio escamoso estratificado. Después de la submucosa laxa se extienden las capas musculares, una interna circular de fibras lisas y una externa longitudinal. Los fondos de saco vaginales se deben a la proyección del cuello.

2.2.7. Vulva

Es la parte más externa y está formada por los labios vulvares, de longitud y el clítoris, que se encuentra en la comisura ventral. Tiene 3 funciones principales: permitir el paso de orina, abrirse en el momento de la cópula y servir de canal del parto. (Hafez E. , 2000)

Los labios de la vulva tienden a verse secos y arrugados en estado normal, pero cuando la oveja entra en celo, la vulva se ensancha y adquiere una apariencia rojiza y húmedo, Inmediatamente después se encuentra el vestíbulo vaginal, que conecta con la vagina y está marcado por el orificio uretral, este representa el primer obstáculo en la inseminación artificial, IA, pues la pipeta podría ser introducida por este orificio. (Hafez E. , 2000)

2.3. Fisiología reproductiva de la hembra

2.3.1. Ciclo estral

El ciclo estral de los ovinos tiene una duración aproximada de 17 días en la fase lútea, que comprende el metaestro y diestro, la concentración de progesterona alcanza valores

de 1 mg / ml o más, esta hormona se sintetiza y libera a partir de un cuerpo lúteo maduro y funcional, en este periodo la hembra manifiesta comportamiento sexual activo, es decir la hembra permite la monta del macho, el macho detecta a la hembra en celos a través de las feromonas que se libera de la secreción vaginal, la oveja es receptiva al carnero únicamente en un periodo de tiempo de 24 a 36 horas denominada celo, y de no quedar preñada repetirá el ciclo mientras dure el fotoperiodo corto, la oveja ovula aproximadamente 48 horas después de la iniciación del celo, son unas de las principales características que pueden presentar los ovinos cuando entran en épocas reproductivas.

Su duración es de 16 a 17 días, con extremos de 14 a 21. Mientras no haya fecundación se repetirá rítmicamente cada 17 días, hasta que continúe el estímulo externo, cuando este desaparece, la oveja va a entrar nuevamente en anestro hasta la próxima temporada sexual. (Becaluba, 2007)

2.3.1.1. Proestro

Es el periodo de preparación para el estro, el cuerpo lúteo regresa y se inicia el crecimiento terminal del o de los folículos, tiene una duración de 2 días. (Becaluba, 2007)

2.3.1.2. Estro

Período en el cual la hembra es receptiva al macho, las manifestaciones clínicas son menos pronunciadas que en la vaca o en la yegua, la oveja en celo puede buscar al carnero, pero hace muy poco esfuerzo por demostrar su deseo sexual, la duración es de unas 24 a 36 horas, pero en borregas es más corto, la presencia del macho o el coito disminuyen la duración del mismo, los estrógenos producidos por los folículos que crecieron rápidamente en el proestro son los responsables de las manifestaciones clínicas del estro, producen también la estimulación del mucus vaginal, enrojecimiento de la vulva y vagina, y engrosamiento del epitelio vaginal.

La ovulación ocurre generalmente a las 14 horas posteriores al pico de LH. (Gordon, 1996, pág. 492)

2.3.1.3. Metaestro

Es el período post ovulación caracterizado por la formación de los cuerpos lúteos que por su secreción impedirán la ovulación tiene una duración de 2 días. (Gordon, 1996)

2.3.1.4. Diestro

Existe uno o varios cuerpo lúteo totalmente desarrollado a partir de los folículos que han ovulado, si se ha producido fecundación el cuerpo lúteo continúa a lo largo de los 145 días de gestación, de lo contrario el cuerpo lúteo permanece útil solo 11 a 12 días y luego regresa (lisis). (Gordon, 1996)

2.3.3. Endocrinología del ciclo estral

Eje hipotalámico hipofisario-gonadal del mamífero. En la pubertad, la secreción pulsátil de GnRH estimula la hipófisis anterior para la liberación de LH y FSH. Estas actúan sobre las gónadas y promueven la gametogénesis y la producción de las hormonas esteroides gonadales, las cuales forman el circuito de retroalimentación para regular la liberación de GnRH, LH y FSH. Las neuronas kisseptina (Kiss1) actúan como el principal nexo para la retroalimentación sobre la secreción de GnRH. En la hembra, los altos niveles de estrógenos y progesterona estimulan las neuronas kisseptina del AVPV y provocan el pico preovulatorio de GnRH/LH, pero inhiben la expresión de Kiss1 en el núcleo arcuata (ARC). En el macho, GnRH y las gonadotropinas son reguladas negativamente por la testosterona circulante, parcialmente a través de la actividad de las neuronas kisseptina del ARC. (De Tassigny & Colledge, 2010)

La hormona Kisspeptina y liberación de GnRH, las neuronas que secretan kisspeptina y las neuronas que secretan GnRH. Las neuronas que expresan KiSS-1 mRNA desde el núcleo arcuata (Arc) y los núcleos peri ventriculares antero ventrales (AVPV), hacen contacto sináptico con las neuronas GnRH dentro del área pre óptica (POA). Sobre la activación del receptor kisspeptina GPR54, las neuronas GnRH son estimuladas para liberar GnRH en la circulación portal, lo cual a la vez estimula la liberación de gonadotropinas, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) de la pituitaria. La kisspeptina es un Neuro péptido. Se conoce que la kisspeptina (Kp) liberada por las neuronas kisspeptina dentro del hipotálamo controla la secreción de GnRH de las neuronas GnRH a través de la interacción con su receptor cognato (KissR/GPR54). Luego, la secreción de GnRH de estas neuronas conduce a la secreción de gonadotropinas (FSH/LH) de las gonado tropaspituitarias. (Smith & Steiner, 2006, pág. 11)

El pico preovulatorio de la hormona luteinizante LH conduce a la ovulación del (o de los) folículo preovulatorio y a la luteinización de la estructura folicular remanente, con la subsecuente formación del cuerpo lúteo, mientras el cuerpo lúteo se desarrolla, las concentraciones de progesterona secretadas por éste aumentan, la progesterona secretada durante la fase luteal ejerce varios efectos durante el ciclo estral: 1) realizan un “priming” sobre los centros comportamentales del cerebro de forma tal que el comportamiento de celo será inducido por el aumento posterior de los estrógenos en la fase folicular, 2) modulan el desarrollo folicular de forma que el próximo pico de LH inducirá la formación de un cuerpo lúteo normal, 3)inhiben la secreción uterina de PgF2a durante los primeros días de la fase luteal, y 4)suprimen la frecuencia de pulsos de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotrofinas (GnRH) por lo que se inhibe la secreción tónica de LH. (Huanca, 2008)

Hacia el día 11-12 del ciclo, se gatilla el mecanismo de retroalimentación (+) oxitocina luteal- PGF2a endometrial que culmina con la lisis del cuerpo lúteo, que lleva a una caída brusca de la progesterona plasmática alrededor del día 14, en éste mecanismo están involucrados tanto la propia progesterona como los estrógenos, quienes controlan la

concentración de receptores para la oxitocina a nivel de las células endometriales, esta caída de la progesterona permite el aumento de pulsaciones de GnRH y LH lo que estimula la secreción de estradiol por el ovario, el aumento sostenido de estradiol estimula el comportamiento estral y los aumentos preovulatorios de GnRH y LH. El aumento de LH induce la ovulación y luteinización, con lo que disminuye la secreción de estradiol, iniciándose un nuevo ciclo.

El rol preponderante que juegan los esteroides ováricos queda evidenciado en los tres eventos críticos del ciclo estral que son la luteolisis, el comportamiento estral, y el proceso de ovulación-luteinización, la progesterona, regulando el mecanismo oxitocina luteal-PGF2 α endometrial, controla la luteolisis; mientras que el aumento de estradiol de la fase folicular es responsable del comportamiento estral y del aumento de los niveles de LH que conducen a la ovulación. (Hincapié, 2004)

El desarrollo folicular en los pequeños rumiantes ocurre en ondas, tanto en la estación reproductiva como durante el anestro estacional, las que emergen a intervalos de 4 a 6 días, en cada onda se selecciona un folículo (en razas monoovulatorias) que ejercerá dominancia sobre los otros que, por su parte se atresiarán, el folículo mayor (dominante) de una onda será el folículo ovulatorio si logra establecer una cascada endocrina con la LH que desemboque en el pico preovulatorio de LH (para que esto suceda no debe existir concentraciones elevadas de progesterona que “bloqueen” al hipotálamo o a la apófisis), en su defecto se atresiará mientras emerge otra onda folicular, por su parte durante el anestro estacional, el folículo dominante de una onda no podrá ovular mientras que los factores exeroceptivos inhibitorios (relación luz /oscuridad y su traducción endócrina) se mantengan y predomine un feedback negativo entre los estrógenos y el eje hipotálamo-hipofisario. (Hincapié, 2004)

Los esteroides ováricos interactúan con las gonadotropinas para regular la dinámica folicular. La emergencia de las ondas foliculares está determinada por la FSH y una elevación de su concentración sérica precede en 1-2 días a cada onda. Los productos foliculares estrógenos e inhibina, sintetizados fundamentalmente por el folículo dominante, retroinhiben negativamente la secreción de FSH, por lo que cuando existe un

folículo dominante la FSH disminuye, y cuando comienza la atresia de ese folículo productor de sustancias inhibitoras, la FSH tiene un pequeño aumento que es el responsable de la emergencia de la siguiente onda folicular, el folículo dominante es dependiente en su fase final de crecimiento también de la LH y en particular de su pulsatilidad, durante el ciclo estral. (Huanca, 2008)

2.4. Métodos de sincronización del estro

(Kelly, 1997) La sincronización del estro involucra el control o manipulación del ciclo estral con el propósito de que las hembras elegidas en un rebaño expresen estro (celo) aproximadamente al mismo tiempo, la base de su éxito consiste en la aplicación del producto en el momento que la hembra presenta cuerpo lúteo, es una técnica biológica mediante el empleo de hormonas exógenas con el objetivo de concentrar la presentación de celos y de esta manera acortar o eliminar la detección de celo, permitiendo predecir el momento de estro con una seguridad razonable.

En el caso de la transferencia de embriones, más que la exacta sincronía del celo y ovulaciones entre ovinos hembras donantes y receptoras y estadio (edad) embrionarios son más importantes puesto que al momento de realizar la colecta de embriones esto presentan una importante variabilidad en cuanto a sus edades es importante también disponer de receptoras que tengan alguna variabilidad en su grado de sincronía del momento de ovulación, esto permitirá elegir la receptora más adecuada para cada tipo de embrión a transferir. (Jiménez, 2009)

2.4.1. Sincronización utilizando progestágenos

El mecanismo de acción de los progestágenos sintéticos utilizados para sincronizar el estro, es inhibir la secreción de LH de la Hipófisis, evitando la foliculogenesis. (Hafez & Hafez, 2002)

Consiste en la aplicación de un dispositivo que puede ser una esponja o un implante denominado CIDR impregnado con una fuente de progesterona, y es aplicada por vía vaginal, imitando la fase luteal del ciclo estral y al final del proceso se aplica una gonadotropina capaz de favorecer la respuesta ovulatoria. (Abecia, Forcada, & González-Bulnes, 2012)

2.4.2. Sincronización utilizando PGF-2 α

Se realiza mediante la aplicación de un análogo de la PGF-2 α induciendo una regresión temprana del CL, interrumpiendo la fase luteal y desencadenando una nueva fase folicular, este método no es efectivo si no existe la presencia de un CL funcional (Universidad Nacional Autónoma De México, 2008). Consiste en una primera aplicación de la hormona que provocara luteolisis solo en las hembras que presenten un CL, 9 a 11 días posteriores se aplica una segunda dosis donde las hembras que no respondieron a la primera aplicación tendrá ya un CL funcional, y las que respondieron tendrán un CL a mitad del ciclo y también tendrán respuesta. (Abecia, Forcada, & González-Bulnes, 2012)

2.5. Tratamiento de estimulación ovárica

Durante la Superovulación, las gonadotrofinas son suplementadas a los efectos de aumentar el número de folículos que ovulan. Su mecanismo de acción está basado en la unión y activación de los receptores de FSH de las células de la granulosa presentes en los folículos. (Beard, 1994)

El aumento de la tasa ovulatoria por encima de la normal inducido por las gonadotrofinas exógenas se produce mediante la combinación de distintos mecanismos. Entre ellos, tiene lugar el reclutamiento de folículos más pequeños, de modo que el tamaño mínimo de los folículos para ser reclutados disminuye a unos 0,8 mm. También se produce una disminución del tamaño de los folículos preovulatorios, a unos 2-3 mm generalmente. (Cerbón, 1995)

Un trabajo reciente ha establecido que los folículos deben alcanzar un tamaño mínimo de 3 mm para lograr ovocitos viables, en tanto que aquellos que miden 2 mm suelen asociarse a mayores tasas de degeneración embrionaria. El reclutamiento de folículos demasiado pequeños, que tendría lugar especialmente en ovejas con tasa ovulatoria elevada, no permitiría un adecuado desarrollo folicular y maduración del ovocito, aun cuando fueran capaces. Un estudio de Robalo(2005), señala que la cantidad de cuerpos lúteos estaría relacionada con la población de folículos de al menos 4 mm al momento del inicio del celo, pero no con la clase más limitada de folículos iguales o mayores a 6 mm, tamaño referido como ovulatoria en ovinos, especialmente de raza Merino. (Driancourt, 1987)

La citada reducción en el tamaño de los folículos ovulatorias ha sido encontrada no sólo en ovejas superovuladas, sino también durante el ciclo estral en hembras de líneas muy prolíficas (Suárez, 2014). Otro mecanismo alterado por la administración de gonadotrofinas es el ritmo de crecimiento del “pool”, de modo que se duplicaría la tasa de crecimiento folicular, alcanzando unos 3 mm/día (Fernández Abella, 1993). Finalmente, la protección folicular de la atresia y la extensión del reclutamiento, aún en presencia previa de folículos grandes, permiten que más folículos sean incluidos en el grupo ovulatoria. (Gherardi, 2001)

Sin embargo, las gonadotrofinas ejercen al mismo tiempo efectos negativos. Entre ellos, aumentan la incidencia de alteraciones en el desarrollo folicular, en la maduración de los ovocitos y en los mecanismos ovulatorias. Frecuentemente, folículos que han iniciado su atresia son rescatados (Irazoqui et al., 2002), pero el desarrollo de esta población folicular suele ser inadecuado, lo que conduce a fallos ovulatorias (Ireland et al., 2005). Asimismo se han observado alteraciones en la competencia folículo-ovocito, en los patrones endócrinos durante los períodos preovulatorios y preimplantacionales, en la capacidad de desarrollo de los embriones y en el ambiente uterino, todas ellas asociadas a una menor y variable viabilidad embrionaria en ovejas superovuladas. (Greve, 2003)

(Mueller, 2008) La Superovulación en ovinos ha sido realizada mediante la utilización de diferentes fuentes hormonales. Entre las hormonas más comúnmente empleadas se

hallan la eCG (Gonadotropina Coriónica Equina; también denominada PMSG, Gonadotropina del Suero de Yegua Preñada) y la FSH (Hormona Folículo Estimulante).

2.5.1. Selección de Donadoras y Receptoras

El elemento fundamental en que se basa la elección de una donadora es su valor genético conforme a criterios apropiados de aptitudes zootécnicas investigadas en la raza en cuestión. En cambio, no se tiene en cuenta ninguna exigencia a este tipo en la selección de receptoras. En todo caso, donadoras y receptoras deberán satisfacer los criterios fisiológicos y patológicos que condicionan el éxito del programa:

Todas las hembras seleccionadas como donadoras deben haber tenido un parto en la temporada reproductiva anterior y deberá haber transcurrido como mínimo de 2 a 5 meses antes de iniciar los tratamientos según la raza. La puesta en reproducción precoz con relación al parto anterior determina con frecuencia una escasa fertilidad. (Ramon, 2003, pág. 66).

Los animales deberán encontrarse Clínicamente sanos y rechazarse los animales que presenten líquidos vaginales que puedan revelar infecciones del tracto reproductor:

- La edad de la oveja es un factor a considerar, ya que se ha observado mejor respuesta en hembras de 2 partos o más que en las primíparas, esto fundamentalmente porque ya existe una madurez sexual y probada fertilidad y prolificidad.
- Por lo que respecta a las hembras donantes, la selección puede basarse en una excelente condición corporal lo que reflejara una mejor respuesta.
- Cuando se trate de hembras nulíparas, éstas deben presentar un desarrollo corporal representativo de al menos el 60% del peso vivo adulto y tener una edad mínima de 8-10 meses.

- Antes de la selección de donantes y receptoras serán sometidas a varios ensayos serológicos para detectar posibles enfermedades contagiosas.
- La selección de receptoras deberán de cubrir los mismos requisitos que las donadoras excepto el valor genético ya que de preferencia serán animales cruzados con alta resistencia y vigor híbrido, buen instinto materno y producción de leche, pues de ellas dependerá la sobrevivencia del cordero.

2.5.2. Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple

El factor intrínseco de cada animal juega un rol primario en la respuesta al tratamiento de ovulación múltiple. Estudios realizados en vacunos demostraron que solamente el 68% de las hembras respondió con embriones transferibles. El 32% restante incluía a las hembras sin respuesta a la estimulación ovárica, sin recuperación de embriones u ovocitos, o con recuperación de embriones no transferibles (Donaldson, 1984). Por consiguiente siempre se debe tener presente que un porcentaje de hembras no responderá al tratamiento hormonal de ovulación múltiple. (Gallardo, 2001)

La variabilidad individual a la respuesta hormonal de ovulación múltiple está condicionada por el estado fisiológico del ovario y por el número de pequeños folículos (1 a 2 mm) en el momento de comenzar el tratamiento hormonal con FSH. (Gallardo, 2001)

En la selección de las hembras donantes se debe tener presente la alta variabilidad individual en la respuesta ovulatoria múltiple. Para evitar un gasto innecesario de tiempo y dinero, es posible realizar una predeterminación de la respuesta ovulatoria. La respuesta individual de cada hembra donante está correlacionada positivamente ($r=+0.7$) con el número de folículos presente al momento de iniciar el tratamiento hormonal de ovulación múltiple la factibilidad de realizar una predeterminación individual por observación laparoscópica permite rechazar las hembras que darán un bajo número de embriones. (Gallardo, 2001)

La raza es otro factor de variación, presentándose en las más prolíficas una mayor respuesta a la ovulación múltiple, embriones transferibles y crías nacidas, la estación sexual también influye sobre el número medio de ovulaciones por hembra ovina, siendo superior en la estación reproductiva con respecto al período de anestro. Esta diferencia no se observó en las cabras aunque la calidad de los embriones fue superior en la época reproductiva. (Gallardo, 2001)

La alimentación juega un rol muy importante en la respuesta a los tratamientos hormonales de ovulación múltiple, debido a que se ha demostrado que no solamente afecta la respuesta ovulatoria sino que es posible que se presenten luteolisis prematuras, tanto en estación como en contraestación sexual, en cabras, la aparición de este fenómeno es muy variable (0% a 27%). Consecuentemente la recuperación embrionaria es baja, debido al transporte anormal de los embriones en el medio uterino este problema también ha sido reportado en ovinos, en la actualidad existen varios factores no bien esclarecidos, que controlan la foliculogénesis, el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos, la ovulación y la fertilización. Los avances que se logren en el entendimiento de sus funciones y sus interrelaciones, determinarán una mayor eficiencia de los tratamientos hormonales de ovulación múltiple, reduciendo los costos e incrementando los beneficios de la TE. (Gibbons S. , 1995, pág. 17)

2.5.3. Colecta de embriones

Los embriones se recogen mediante lavados sucesivos de los cuernos uterinos. Para ello se inyecta una solución fisiológica (PBS: Phosphate buffered saline) en un extremo de los cuernos y el flujo generado empuja los embriones al extremo opuesto del cuerno, donde se recuperan mediante un catéter colector.

La metodología empleada para la colecta de embriones consiste en inyectar un medio líquido para producir una corriente de arrastre (lavado o Flushing) a través de los cuernos uterinos. El medio que se utiliza es el PBS (Solución Buffer Fosfato) enriquecida

con 4% de Albúmina sérica bovina (BSA fracción V) o 10% de suero fetal bovino. En general, la colecta de embriones se realiza entre los días 6º a 7º, posterior al día de inicio del celo (día cero).

La razón de estos tiempos se debe a los siguientes fundamentos: -Los embriones están en el tercio superior de los cuernos uterinos. -Presentan la membrana pelucida, necesaria como barrera sanitaria. -La congelación se realiza en estado de mórula compacta o blastocisto. (Romo, 1993).

Las técnicas para la colecta de embriones en los rumiantes menores son:

- Técnica quirúrgica -laparotomía media.
- Técnica no quirúrgica -laparoscopia.
- transcervical (Elsden, &Seidel 1986). Estas intervenciones se llevan a cabo bajo anestesia general. Es indispensable que los animales no reciban alimento ni agua, en las 24 horas previas a la operación. Se utiliza un tranquilizante y un anestésico, es posible realizar una combinación de Xilazina (0.11 mg/kg) y Clorhidrato de ketamina (5.5 mg/kg), suministrando esta última a los 10 minutos de la primera (Martínez, 1999).

2.5.3.1. Técnica quirúrgica

La hembra se ubica en un plano inclinado en una camilla (cabeza hacia abajo).

Se rasura y se desinfecta el campo operatorio. Se realiza una laparotomía media de 5 a 7 cm, y a 3 cm por delante de la ubre. Antes de comenzar con la recuperación embrionaria se realiza la exteriorización de los ovarios, para determinar la respuesta ovulatoria (número de cuerpos lúteos).

La intervención consiste en la colocación de una sonda, se realiza una punción en la unión útero tubárica con aguja roma numero 18 o catéter intravenoso o bien con la punta de una pinza de mosquito y se coloca la sonda en el interior de la luz del cuerno uterino (1 cm),. Aproximadamente a un par de cm de la bifurcación de los cuernos uterinos, se realiza una segunda punción, para la inyección de 20 cc de medio de colecta a 37°C. De esta manera se produce una corriente de arrastre que fluye hacia el oviducto y que sale por la sonda(Nº 8) hasta un filtro emcom de colecta.

Finalizada la recuperación embrionaria, se realiza la sutura de los planos quirúrgicos y se administran antibióticos. Se procede de igual manera con el otro cuerno uterino. También es posible ubicar una sonda de Foley en la bifurcación de los cuernos uterinos, recuperando el líquido de colecta por la misma sonda. El medio recuperado es vaciado en cajas de Petri cuadriculadas para proceder a la búsqueda de embriones bajo un microscopio estereoscópico con lente 10X. Esta técnica permite una recuperación del 70% de los embriones. El inconveniente que presenta es la formación de adherencias post quirúrgicas que reducen la eficiencia de posteriores recuperaciones embrionarias (León et al., 2009).

2.5.3.2. Técnica no quirúrgica

La técnica no quirúrgica o por laparoscopia, fue desarrollada por (Mc Kelvey, Robinson, Aitken, & Robertson, 1986) en ovinos, se realizan tres punciones (con trócares) en la cavidad abdominal. La primera punción permite introducir el laparoscópico; la segunda, una sonda de tres vías (cada vía corresponde a: 1) entrada del PBS, 2) salida del PBS e 3) insuflación del balón); y la tercera, una pinza no traumática. Esta pinza permite la manipulación del tracto reproductivo, a fin de hacer avanzar la sonda por la luz uterina, y fijar la unión útero tubarica durante el flujo del PBS. Esta técnica requiere un muy buen entrenamiento y su costo es elevado debido a la necesidad de disponer de un laparoscopio. Presenta una menor eficiencia en la recuperación de embriones (60%). La obstrucción de la sonda por coágulos o mucus representa a veces una gran dificultad; pero su ventaja es que no crea

adherencias y por lo tanto no se disminuye el porcentaje de recuperación embrionaria en intervenciones sucesivas. El tiempo medio para realizar una recuperación de embriones es de aproximadamente 15 a 20 minutos (quirúrgica) y 20 a 30 minutos (por laparoscopia) por hembra. (Nellenschulte y Niemann 1992).

La recuperación embrionaria transcervical no ha alcanzado amplio desarrollo, debido a que es una técnica cuya eficiencia es muy variable. Independientemente de la técnica de recuperación embrionaria utilizada, se debe administrar prostaglandinas PF2 alfa al final de las intervenciones, para estar seguros que las hembras no han quedado preñadas (Bessoudo et al., 1988).

2.6. Evaluación y clasificación de embriones

El medio colectado con embriones es vertido en una placa de búsqueda de embriones. La búsqueda se realiza bajo lente 10x con sumo cuidado. Se recomienda efectuar siempre una segunda lectura de la placa. A medida que se identifican los embriones, los mismos son aspirados mediante micro pipetas, puntas o capilares y colocados en una caja de Petri con medio para transferencia enriquecido, Una vez finalizada la búsqueda, se procede a la clasificación de los embriones. Se recomienda trabajar en condiciones estrictas de esterilidad. (International Embryo Transfer Society, pág. 79)

La clasificación de los embriones se realiza en base a sus aspectos morfológicos, se debe observar la integridad de la membrana pelucida y su esfericidad. El embrión debe tener un desarrollo acorde con el día de colecta; se tolera hasta un máximo de 48 horas de retraso. En el día 6to o 7mo, se deben descartar los embriones de menos de 32 células. Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración. En algunos embriones, se puede observar desprendimiento parcial de células en el espacio perivitelino. Esta característica es tolerable si el resto conforma una masa celular uniforme y sin opacidad.

Cuando los embriones son dudosos, se recomienda realizar una segunda observación a las dos horas. Este tipo de examen morfológico no constituye un test absoluto de la viabilidad embrionaria. Sin embargo se presentan diferencias significativas en el porcentaje de preñez cuando se transfieren embriones de calidad media o mediocre respecto a la calidad buena o excelente. Esta diferencia es mayor cuando se procede a la siembra de embriones que fueron congelados en nitrógeno líquido.

2.6.1. Grados de clasificación de embriones

Clase 1: calidad excelente.

Embrión ideal, esférico, simétrico con células de tamaño, color y textura uniforme. Desarrollo embrionario correspondiente al día de recolección. No existen defectos visibles los blastómeros son visibles y la zona pelucida está intacta.

Clase 2: calidad bueno.

Posee imperfecciones triviales, el embrión tiene pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas. Su forma puede ser ligeramente irregular.

Clase 3: calidad regular.

El embrión posee defectos definidos: detritus celular, forma irregular, color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelucida. Pocas células degeneradas, vesículas y presencia de blastómeros desprendidos.

Clase 4: calidad Malo.

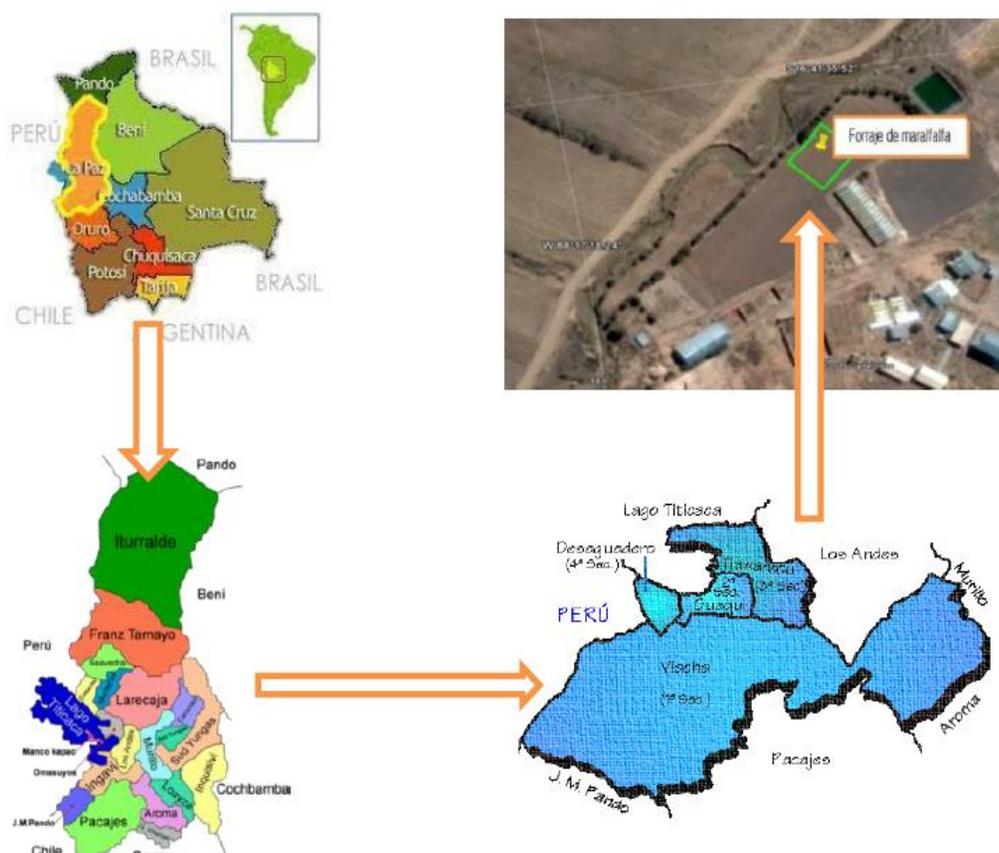
El embrión posee severos defectos: los correspondientes a la calidad 3 más desarrollo retardado, sería ruptura de la zona pelucida (el embrión puede estar parcialmente fuera de la misma), forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración con granulación y vacuolización de los blastómeros. Incluye a los estados hasta 8 células y la degeneración. Esta categoría de embriones no es transferible.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en la Estación Experimental de Choquenaira de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, ubicado de la primera sección del cantón Viacha, provincia Ingavi del departamento de La Paz, a una altura de 3850 m.s.n.m. ubicada a los 16° 42' 5" altitud sur y 68° 15' 15" longitud oeste (SENAMHI, 2004, citado por Arguedas, 2005) a una distancia de aproximada de 32 km de La Paz y a 6 km de localidad de Viacha.

Figura 1. Localización del trabajo de investigación



3.2. Materiales

3.2.1. Materiales biológicos

- 8 ovinos donadoras de 4 años de edad

3.2.2. Materiales para superovulacion

- Sonda Foley de 2 vías
- Termómetro
- Cocinilla eléctrica
- Olla de 2 L
- Bandeja porta instrumental quirúrgico
- Aplicador de esponja Intravaginal
- Jeringas de 5 ml
- Jeringas de 1 ml
- Placas Petri de 4 a 6 pocillos
- Placas Petri medianas
- Pipetas FIV
- Algodón
- Gasa
- Papel toallas unidades
- Jabón carboxílico
- Guantes látex caja
- Catgut crómico de 000
- Catgut crómico de 00
- Catgut crómico de 0
- Nylon metro
- Hojas de bisturí unidades

- Hojas de afeitar caja
- Tijera de esquila
- Baldes
- Lavadores
- Basureros

3.2.3. Medicamentos medios y hormonas

- Medios de colección de embriones
- Medios de mantenimiento, sachet
- Suero fisiológico
- Penicilina procaica en polvo gr
- Violeta de genciana mL
- Ciprofloxacina ml
- Promazil ml
- Lidocaína ml
- Alcohol al 70 %
- Esponjas intrabajinales
- eCG
- Prostaglandina PGF2 α
- Benzoato de estradiol
- Xilacina

3.2.4. Equipos

- Camilla reclinable
- Estereoscopio
- Platina térmica
- Plato térmico

3.2.5. Desparasitantes y vitaminas

- Ivomec de 100 ml y vitamina ADE- selenio

3.3. Métodos

3.3.1. Selección de ovinos donadoras de embriones

Se seleccionó mediante un examen ginecológico de los órganos genitales con el uso de la ecografía de 8 ovinos hembras de la raza corriedale, aproximadamente de 3 años de edad con un peso vivo de 50 a 60 kg, en base a sus antecedentes de fertilidad considerando los siguientes requisitos: condición corporal de 2.5 a 3.5, ciclo estral normal y que no presente retención placentaria en su vida útil, propuesto por Gallardo. (Gallardo, 2001)

3.3.2. Etapa de Vitaminización y desparasitación

La Vitaminización y desparasitación se realizó 20 días antes de empezar con el trabajo de investigación, para la desparasitación se utilizó ivermectina que actúa contra los parásitos externos e internos, y posteriormente se les administro vitamina ADE.

3.3.3. Alimentación bajo sistema Flushing de los ovinos donadoras

Los ovinos donadoras fueron sometidos bajo un sistema de alimentación a dlibitum sobre alfalfares, tomando en mente que deben mantener un buen grado de condición corporal. Para la desparasitación se utilizó ivermectina que actúa contra los parásitos internos y externos, asimismo se adicionaron vitaminas ADE y minerales (P, Se).

3.3.4. Sincronización de estro y tratamiento de Superovulación de ovejas donadoras

Inicialmente los ovinos han sido distribuidos en dos grupos, el primero grupo ha recibido la dosis de 800 UI y el segundo grupo se aplicó 1000 UI de la hormona Coriónica Equina por vía intramuscular.

Cuadro 1 Protocolo de Superovulación en ovinos donadoras (1000 UI eCG)

Día0:	Con la ayuda de un aplicador se colocó la esponja a base de progesterona (P4) en la vagina de la hembra ovina.
Día 11:	Se administró una dosis única de 5 ml de la hormona eCGequivalentea1000UIvía intramuscular
Día 12:	Se procedió al retiro de la esponja intravaginal y simultáneamente se aplicó 1 ml de prostaglandina F2 α .
Día 13:	Detección de celo de 36 a 72 horas post retiro de la esponja intravaginal + empadre + 2 ml de GnRH.
Día19:	Colección y evaluación de embriones por método quirúrgico (laparotomía)

Cuadro 2 Protocolo de Superovulación en ovinos donadoras (800 UI eCG)

Día0:	Con la ayuda de un aplicador se colocó la esponja a base de progesterona (P4) en la vagina de la hembra ovina.
Día 11:	Se administró una dosis única de 4 ml de la hormona eCGequivalentea800UIvía intramuscular.
Día 12:	Se procedió al retiro de la esponja intravaginal y simultáneamente se aplicó 1 ml de prostaglandina F2 α .

Día 13:	Detección de celo de 36 a 72 horas post retiro de la esponja intravaginal+ empadre + 2 ml de GnRH.
Día19:	Colección y evaluación de embriones por método quirúrgico (laparotomía)

3.3.4.1. Procedimiento para colocación de esponja intravaginal

- Se desinfectó el aplicador de esponjas con DG-6 (Piridonio cloruro).
- Se colocó la esponja en la extremidad posterior del aplicador de esponjas.
- Se abrió la vulva e introdujo el aplicador lubricado, se lo deslizó suavemente hasta el fondo de la vagina, se retiró ligeramente el aplicador, se empujó la esponja con ayuda del embolo hasta que salga del tubo aplicador.
- Se retiró de la vagina el tubo aplicador y el émbolo del aplicador suavemente (Daza, 1997).

3.3.5. Etapa de empadres de ovejas donadoras

Una vez que se ha retirado las esponjas Intravaginal de los ovinos donadoras a las 52 horas se realizó el empadre con ovinos machos en tres oportunidades (8:00 am, 14:00 pm y 20:00 pm).

3.3.6. Preparación del ambiente y materiales para el lavado de embriones

Para la desinfección de todo el laboratorio se utilizó alcohol al 70% y posteriormente se procedió al atemperado el laboratorio a 28 °C con la estufa eléctrica.

Los materiales de vidrio fueron esterilizados en autoclave, y otros materiales como placas Petri, tubos falcón, etc. Fueron desinfectados en cámara de UV con la finalidad de minimizar la contaminación.

3.3.7. Preparación de las donadoras para el lavado de embriones

- Se realizara la aplicación de tranquilizante a cada donadora vía intra muscular.
- Se colocó a la oveja en la camilla con la cabeza hacia abajo, se sujetó a la oveja, seguidamente se realizó el lavado con agua y jabón luego la tricotomía con una afeitadora en la parte abdominal y se desinfectara con un atomizador donde se realizara la incisión.
- Se administró 5 ml de lidocaína al 2% como anestésico local.
- Se realizó la incisión de 8 a 10 cm, a 3 cm por delante de la ubre, en la línea alba, hasta entrar a cavidad abdominal, exteriorizar los ovarios y útero (Morrow et al., 1994; Pugh&Baird, 2012).
- Posteriormente con la ayuda de los dedos índice y medio se ubicó los órganos reproductores de la hembra, exponiendo hacia afuera los cuernos uterinos y ovarios.

3.3.8. Etapa de colección de embriones

Los embriones se recogieron mediante lavados sucesivos de los cuernos uterinos. Para ello se inyectó una solución fisiológica (PBS: Phosphatebufferedsaline) en un extremo de los cuernos y el flujo generado empuja los embriones al extremo opuesto del cuerno, donde se recuperaron mediante un catéter colector.

La metodología empleada para la colecta de embriones consistió en inyectar un medio líquido para producir una corriente de arrastre (lavado o flushing) a través de los cuernos uterinos. El medio que se utiliza es el PBS(Solución Buffer Fosfato) enriquecida

con 4% de Albúmina Sérica Bovina (BSA fracción V), bajo el siguiente procedimiento:

- La colección de embriones se realizó a los 7 días posteriores a la monta natural.
- Las ovejas superovuladas fueron sometidas al ayuno 24 horas antes del lavado.
- Una vez expuestos los ovarios uterinos se introdujo el catéter de Foley de dos vías (8 Fr/Ch), colocando el catéter en el tercio superior del cuerno uterino derecho, luego en el cuerno izquierdo.
- Posteriormente con una aguja intravenosa se insertó en la unión útero tubárica para el ingreso del medio de lavado (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PSB)).
- Seguidamente se retiró la sonda Foley y se lo introdujo a una placa Petri, donde se recolectó el medio de lavado con los supuestos embriones.
- La placa Petri con el medio de lavado y los embriones fueron trasladado al laboratorio, a una temperatura de medio ambiente, luego se inició con la búsqueda y selección de los embriones.
- Una vez terminado el lavado de los cuernos uterinos, se suturó los planos quirúrgicos, el plano muscular-aponeurótico con una sutura reabsorbible, y el cutáneo con una sutura no absorbible. Se administró un antibiótico de amplio espectro y larga acción, analgésico y un análogo de la prostaglandina F₂α.

3.3.9. Manipulación de embriones

- Concluido el lavado de los cuernos uterinos, se trasladó la placa Petri que contenía los embriones y dejando sedimentar durante 10 minutos.
- Luego se utilizó el estereoscopio para identificar los embriones.

3.3.10. Búsqueda y conteo del número de embriones

- Primeramente se ubicó los embriones en las placas de cultivo en 6 pocillos de fondo redondo con tapas, con ayuda de Unopette de 20 ul para la manipulación de embriones.
- Luego se realizó la búsqueda y el conteo de embriones, con la ayuda de un equipo de micro estereoscopio de 40 a 180 X.

3.3.11. Evaluación de la calidad morfológica de los embriones

Los embriones colectados fueron lavados 6 veces en medio de mantenimiento para el cual se emplearon en medio Bovi PRO TM Holding Medium (medio de mantención), Solución tampón iónica bipolar conteniendo D-Glucosa, Piruvato de Na, BSA 0.4%, aminoácidos, factores de crecimiento, vitaminas, Kanamicina y gentamicina.

Una vez que se encontró al embrión se procedió a la evaluación observando el estadio de desarrollo de los embriones, luego se registró las características morfológicas que presentaron cada uno de ellos y se compararon con los parámetros de clasificación que presenta la IETS que describe (Gibbons S. , 1995), de esta manera fueron categorizados los embriones según su calidad, estableciéndose las siguientes categorías: Embriones excelentes, embriones buenos, embriones regulares y embriones malos.

3.4. Factor de estudio

- Protocolo de Superovulación a base de Hormona Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) con 800 y 1000 UI.

3.5. Variables de respuesta

Para la evaluación de embriones post Superovulación, se considerarán las siguientes variables de respuesta.

- Número de cuerpos lúteos
- Número de embriones

3.6. Análisis estadístico

Para analizar los resultados, se empleó la prueba de T student:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

Dónde:

X1 = es el promedio de los valores de la muestra 1

X2 = es el promedio de los valores de la muestra 2

S1 = es la varianza de los valores de la muestra 1

S_2 = es la varianza de los valores de la muestra 2

N_1 = es el número de elementos de la muestra 1

N_2 = es el número de elementos de la muestra 2

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados del conteo de cuerpos lúteos

Los resultados del conteo de cuerpos lúteos de ovejas donadoras superovuladas con la aplicación de la Hormona Gonadotropina Coriónica Equina (eCG), diagnosticadas a los 19 días del protocolo de superovulación en tiempo fijo se presentan en tabla N° 1.

Figura 1. Conteo de cuerpos lúteos.

Tratamiento 2	cuerpos lúteos	tratamiento 1	cuerpos lúteos
1000 UI (eCG)	3	800 UI	4
1000 UI (eCG)	4	800 UI	3
1000 UI (eCG)	4	800 UI	2
1000 UI (eCG)	2	800 UI	5
promedio	3,25	promedio	3,5
des	0,96	des	1,29
total	13	total	14

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N°1, observamos tasa de conteo de número de cuerpos lúteos por cada oveja superovuladas con una dosis de 800 y 1000 UI de (eCG), en el cual las ovejas son de 4 años de edad respondieron al protocolo de Superovulación una totalidad al 100%, estas al ser sometidos al análisis estadístico de prueba de T de student se evidenciaron que no hay diferencias significativas por efecto de dosis de hormona empleada a las ovejas que ya tenían anteriormente partos.

4.2. Determinación del número de cuerpos lúteos a efecto de Superovulación con 800 y 1000 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) en ovinos

Figura 2. Número de cuerpos lúteos observados mediante laparotomía

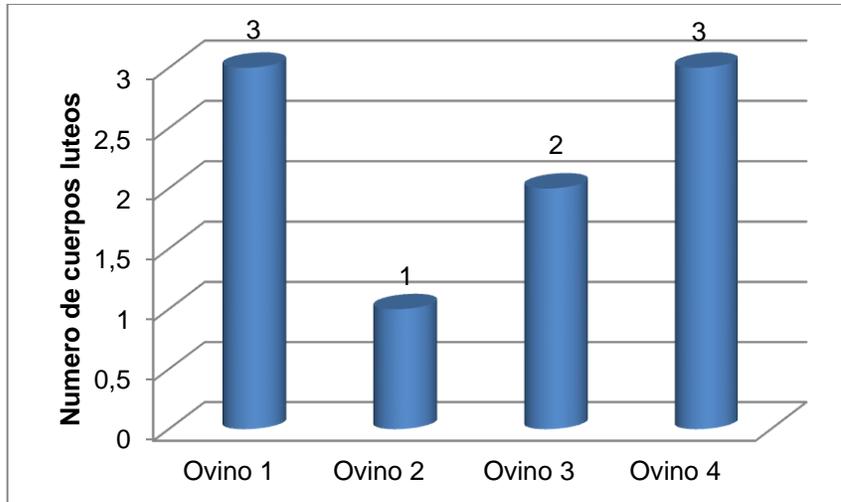
Tratamiento	N	Promedio cuerpo lúteos	Desviación estándar	P>t
T1 (800 UI eCG)	4	3.50	1.29	
T2 (1000 UI eCG)	4	3.25	0.96	0.7663

Fuente: Elaboración propia

El número de cuerpos lúteos obtenidos (cuadro 1) en el tratamiento 1 fue de 3.50 ± 1.29 mientras que para el tratamiento 2 fue de 3.25 ± 0.96 .

A nivel de 5% dado que $P = 0.7663$ es mayor a nivel alfa 0.05, se concluye que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el promedio de cuerpos lúteos del T1 y el T2. Estos resultados confirman la hipótesis nula demostrando que los animales del T1 tienen igual respuesta ovulatoria que los animales del T2.

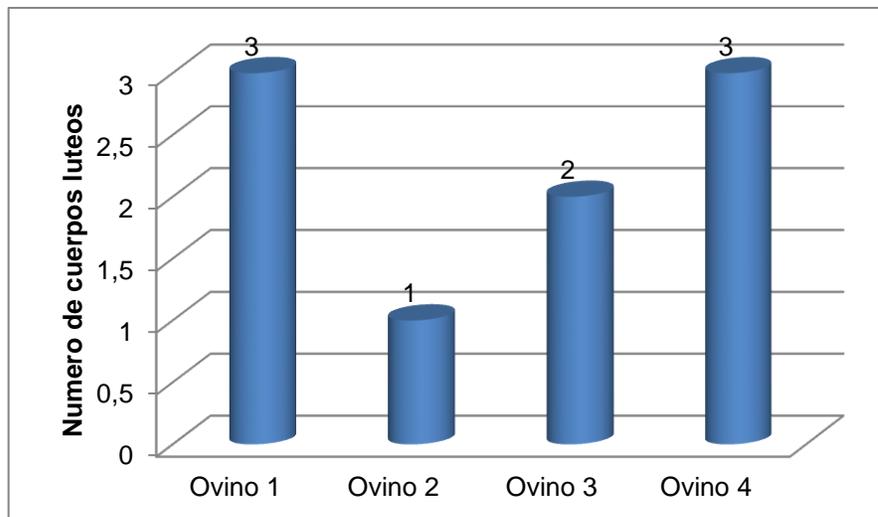
Los resultados obtenidos son inferiores a los reportados por Blanco et al. (2003) quienes obtuvieron 6.2 ± 0.8 con una dosis de 1200 UI de eCG y 11 ± 3.0 cuerpos lúteos con una dosis de 1600 UI de eCG, encontrando una diferencia significativa entre los tratamientos. Así mismo los resultados son inferiores a los obtenidos por Azawi et al. (2011) los mismos que obtuvieron 7.33 ± 0.54 cuerpos lúteos utilizando una dosis de 1200 UI de eCG.



Fuente: Propia (2019).

Figura 3. Número de cuerpos lúteos en ovinos donadoras a base de 1000 UI eCG.

En el figura 1. Se observa la respuesta ovárica sobre el número de cuerpos lúteos presente en los ovinos donadoras tratadas a base de 1000 UI de la Hormona Corionica Equina, ovinos donadoras 1, 2, 3 y 4 lograron producir 3, 4, 4 y 2 cuerpos lúteos, respectivamente.



Fuente: Propia (2019).

Figura 4. Numero de cuerpos lúteos en ovinos donadoras a base de 800 UI eCG.

En el figura 2, se observa la respuesta ovárica sobre el número de cuerpos lúteos presente en los ovinos donadoras tratadas a base de 800 UI de la Hormona Coriónica Equina, ovinos donadoras 1, 2, 3 y 4 lograron producir 4, 3, 2 y 5 cuerpos lúteos, respectivamente.

Morales y Salazar (2017), compararon dos protocolos de Superovulación utilizando 1000 y 1500 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) en la producción de embriones ovinos, el número de cuerpos lúteos se logró en el tratamiento I (5.40 ± 3.02) y en el tratamiento II (9.8 ± 5.20), valores que son superiores a la presente investigación.

(Liu, 2007), un factor determinante en la respuesta al tratamiento superovulatoria además de la dosis administrada de eCG son las características intrínsecas de cada individuo sus estudios muestran que solamente el 68% de las hembras respondieron al tratamiento y el 32% restante no tuvo respuesta a la estimulación, por consiguiente siempre se debe tener presente que un porcentaje de hembras no responderá al tratamiento hormonal de ovulación múltiple.

Los resultados obtenidos confirman lo mencionado por (Bartlewaki, y otros, 2016), donde indica que a pesar del extenso conocimiento de la fisiología ovárica, particularmente de dinámica folicular y su supuesta relación con el resultado superovulatoria, ha proporcionado valiosas pautas e indicios para predecir la respuesta superovulatoria anticipada de las ovejas donantes. Sin embargo, al existir una continua falta de consistencia en los rendimientos superovulatorios entre diversos estudios, sugiere que es necesario cambiar y ampliar la orientación de los estudios, más allá de modificaciones en protocolos de estimulación ovárica, sino enfocarse ahora en la evaluación de aspectos relacionados con la condición gonadal, tales como: la medición de las concentraciones séricas de hormonas ováricas (Inhibina A, estrógeno, FSH y LH endógena), evaluar la presencia y número de estructuras ováricas (folículos y CL), además el flujo sanguíneo en el tracto reproductivo.

La caracterización de perfiles hormonales podría enfocarse a establecer dichos perfiles en base a características específicas como: razas (prolíficas y no prolíficas), edad, historia reproductiva (núlparas, multíparas), regiones geográficas y temporadas, incluso para diferentes tipos de progestágenos usados en la sincronización del estro. Factores hemodinámicos podrían tener una interacción en la salud folicular y la calidad del ovocito que a través de ecografía Doppler permitiría establecer una relación individual en la respuesta ovulatoria. (Bartlewaki, y otros, 2016)

Otro de los factores que puede dar una variación en la respuesta individual a la estimulación hormonal según (Bruno, y otros, 2014) está el estado fisiológico del ovario y por el número de folículos al iniciar el tratamiento hormonal. Lo cual es corroborado por; (Mossa, Duffy, Lonergan, & Evans, 2007) demostrando que en su estudio los animales con el mayor número de folículos (≥ 8) con un diámetro ≥ 2 mm denominado grupo alto al iniciar la Superovulación produjeron más cuerpos lúteos ($p < 0.05$) con relación a los que presentaban menos folículos (< 7) denominado grupo bajo al inicio de la Superovulación. Además el número de embriones totales, y de buena calidad fue mayor en el grupo alto pero sin existir una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a dicha calidad, y tampoco se vio afectada la tasa de recuperación embrionaria.

La variabilidad en el número de folículos es aún desconocida, pero podría estar influenciada por factores intrínsecos como el número de folículos primordiales al nacer (Erickson, 1966), mecanismos genéticos (Spearow & Bradfoed, 1983), niveles hormonales o por factores externos como nutrición (Lucy et al., 1991) condiciones ambientales citado por (Mossa, Duffy, Lonergan, & Evans, 2007)

En cuanto al número de folículos al inicio del tratamiento superovulatoria (Bartlewaki, y otros, 2016) establece que no se relaciona con la respuesta ovulatorias, pero establece una relación entre el número de folículos de tamaño mediano es decir 4 mm de diámetro detectados 12 horas después de la primera inyección de pFSH con el número CL y embriones viables después de la superovulación. Puesto que a pesar de la existencia de

los receptores de gonadotropina sólo una parte de folículos podría utilizar FSH exógena para el crecimiento que culminara en la ovulación y posterior formación del CL.

Según varios autores mencionan que la dominancia folicular tiene un efecto perjudicial sobre el resultado superovulatorio en ovejas, disminuyendo el número de ovulaciones, viabilidad y recuperación embrionaria, asociando la presencia de un folículo dominante con disminución en la tasa de ovulación y recuperación embrionaria. (Bartlewaki, y otros, 2016)

Figura 5. Colecta de embriones a efecto de (eCG).

tratamiento 1	embriones	tratamiento 2	embriones
800 UI	3	1000 UI	0
800 UI	1	1000 UI	2
80 UI	2	1000 UI	1
80 UI	3	1000 UI	2
Promedio	2,25	Promedio	1,25
D.E.	1,29	D.E.	0,96
Suma	9	Suma	5

Fuente: Propia (2019).

Ref.: D.E.: Desviación estándar; UI: Unidades Internacionales

La tabla 2 muestra el número de embriones colectados a efecto de la Hormona Gonadotropina Coriónica Equina (eCG), con una dosis de 800 y 1000 UI aplicadas a 8 ovejas donadoras donde se encontraron un 99% de embriones, esto al ser sometido a la prueba estadística de prueba de T student reflejaron que no existe diferencias significativas ($P \geq 0,05$) por efecto de la hormona.

5.3. Determinación del número y calidad de embriones a efecto de Superovulación con 800 y 1000 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) en ovinos

Figura 6. Embriones obtenidos mediante lavado uterino, y clasificación.

Tratamiento	n	Promedio de embriones	Nº Embriones viables	Nº Embriones no viables	Análisis estadístico
T1 (800 UI eCG)	4	2.25 ± 0.96	3	2	
T2 (1000 UI eCG)	4	1.25 ± 0.96	5	4	0.1901

Fuente: Propia (2019).

El promedio de embriones obtenidos (cuadro 2) en el tratamiento 1 fue 2.25 ± 0.96 embriones por donadora. En el tratamiento 2 el número de embriones fue 1.25 ± 0.96 . A nivel de 5% dado que $P = 0.1901$ es mayor a nivel alfa 0.05, se concluye que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el promedio de embriones del T1 y el T2. Con estos resultados se acepta la hipótesis nula demostrando que los animales del T1 tienen igual respuesta ovulatoria que los animales del T2.

Para el T2 con un promedio de 1.25 ± 0.96 embriones obtenidos por oveja es similar frente al promedio reportado por Blanco et al. (2003) donde obtuvo un promedio de 1.0 ± 0.5 embriones por oveja y para el T2 el resultado 2.25 ± 0.96 embriones obtenidos por oveja es superior frente a 1.2 ± 0.6 embriones por oveja reportado por Blanco et al. (2003) a pesar de tener una dosis menor para la estimulación.

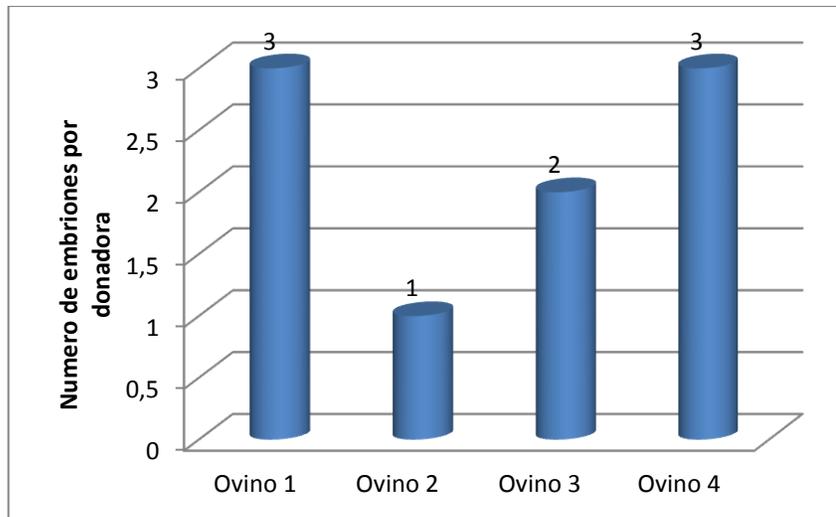
Los estudios anteriores (Jabbour, 1991) (Evans & Armstrong, 1984), Chagas e Silva et al., 2003), demostraron que una dosis alta de eCG puede causar el desarrollo de folículos anovulatorios probablemente debido a la larga vida media de esta hormona. Dichos folículos con una alta producción hormonal podrían producir elevadas concentraciones de estradiol, afectando el medio uterino interfiriendo con el transporte de óvulos al momento de la captura de óvulos por las fimbrias (Murray et al., 1994) y

espermatozoides a través del tracto genital femenino afectando la recuperación de embriones citado por (Blanco, Simonetti, & Rivera, 2003)

En estudios que comparan tratamiento superovulatorios utilizando pFSH y eCG, coinciden que la pFSH produjo mayor número de embriones viables y mejor desarrollados, en comparación con la eCG. Posiblemente porque la pFSH, al ser una glucoproteína natural, con menor vida media que es captada y metabolizada más fácil y eficientemente. (Blanco, Simonetti, & Rivera, 2003)

(Bartlewaki, y otros, 2016) Reportaron que folículos ≥ 4 mm de diámetro el día de la remoción de la EIV se asoció con una aparición temprana de estro y aumento de la LH circulante y una mayor tasa de ovulación. Sin embargo, la tasa de recuperación de embriones disminuyó significativamente en ovejas con picos de LH preovulatorios tempranos, por consiguiente bajas en la recuperación de embriones que pueden anular el número de ovulaciones en ovejas con un alto número de pequeños folículos presentes al inicio de la estimulación hormonal, a pesar de ello no es clara la relación que existe por lo que sugiere más estudios para aclarar dichas relaciones en ovejas.

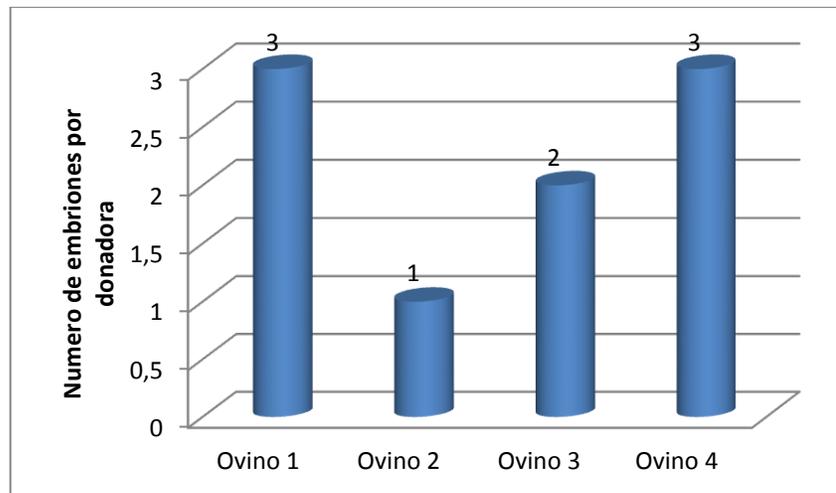
Existen factores antes mencionados los que en conjunto van a inferir y modificar la respuesta ovulatoria y la recuperación embrionaria, para lo cual sería necesario evaluar más aspectos como perfiles hormonales que deben ser evaluados durante todo el tratamiento hasta la recuperación embrionaria, además características y cambios en los ovarios antes, durante y después de la estimulación hormonal, que podrían tomarse en cuenta para futuros estudios.



Fuente: Propia (2019).

Figura 7. Producción de embriones por donadora a base de 1000 UI eCG

En el figura 3. Se observa la respuesta ovárica sobre el número de embriones de acuerdo a los ovinos donadoras tratadas a base de 1000 UI de la Hormona Corionica Equina, los ovinos donadoras 1, 2, 3 y 4 lograron producir 0, 2, 1 y 2 embriones, respectivamente.



Fuente: Propia (2019).

Figura 8. Producción de embriones por donadora a base de 800 UI eCG.

En el figura 4. Se observa la respuesta ovárica sobre el número de embriones de acuerdo a los ovinos donadoras tratadas a base de 800 UI de la Hormona Corionica Equina, los ovinos donadoras 1, 2, 3 y 4 lograron producir 3, 1, 2 y 3 embriones, respectivamente.

5. CONCLUSIONES

- En relación al número de cuerpos lúteos obtenidos 3.50 ± 1.29 en el tratamiento 1 con 800 UI de eCG mostro una mejor respuesta ovulatoria que el tratamiento 2 con 1000 UI eCG donde se obtuvo 3.25 ± 0.96 cuerpos lúteos, con estos resultados se demuestra que los animales del T1 tienen diferente respuesta ovulatoria que los animales del T2. La cantidad de cuerpos lúteos registrados al momento del lavado es directamente influenciada por el porcentaje de ovulación, siendo que algunos folículos preovulatorios no llegan a ovular, estos terminan por regresar y por consiguiente no forman cuerpos lúteos en su lugar.
- El número de embriones obtenidos en el tratamiento 1 (2.25 ± 0.96) con 800 UI de eCG fue mayor que el número de embriones obtenidos en el tratamiento 2 (1.25 ± 0.96) con 1000 UI de eCG. La baja cantidad de embriones colectados en la presente investigación, posiblemente se deba a que los óvulos no entrarían suficientemente maduros para una fecundación eficiente; debido a efecto de la hormona de super estimulación. Con relación a embriones transferibles en el tratamiento 1 (3 embriones viables) fue menor en comparación al segundo tratamiento 2 (3 embriones viables), respectivamente. La diferencia de los resultados podría atribuirse que la eCG tiene un elevado peso molecular, no atraviesa el filtro renal y por lo tanto tiene larga vida media, en sangre. Esto permite inducir superovulación en la hembra bovina mediante la administración de una dosis única entre los días 8 y 14 del ciclo estral.
- Sin embargo, su permanencia prolongada en sangre provoca un crecimiento folicular disperso, con niveles altos de estrógenos que afectan tanto la tasa de fertilización como la calidad embrionaria. Además de generar procesos inmunitarios que hacen necesario, en tratamientos posteriores, emplear una mayor dosis de hormona para lograr el mismo efecto.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones donde se utilice protocolos a base de FSH para producir mayor cantidad de embriones y su posterior transferencia de embriones.
- Realizar seguimiento de los ovinos donadoras con super estimulación ovárica mediante la utilización del ecógrafo antes del lavado de embriones.
- Seleccionar a hembras de última campaña y a punto de terminar su ciclo vital ya que son donantes potenciales, que a veces son eliminadas de la reproducción por su avanzada edad, pero por tener mejores índices reproductivos, se las debe aprovechar el máximo de ovocitos que aun poseen, de esta manera estarían prolongado la vida reproductiva de animales con potencial genético.
- Se recomienda realizar trabajos de investigación tomando en cuenta la Superovulación con diferentes protocolos para así poder mejorar la genética de los animales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abecia, A., Forcada, F., & Gonzále-Bulnes, A. (2012). *Hormonal control of reproduction in small ruminants*. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>
- Alonso, G. (2004). *Evaluación de dos tratamientos superovulatorios con FSHp y FSHo en ovino*. Facultad de Medicina y Veterinaria.
- Ayala. (2013). *Inseminacion Artificial*. La Paz.
- Bartlewaki, P., Seaton, P., Emilia, M., Oliveira, F., Kirdli, R., & Schwarz, T. (2016). *Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep. Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antrai follicular blood flow*. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.024>
- Beard. (1994). estradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced.
- Becaluba. (2007). *Métodos de sincronización de celos en ovinos y bovinos*. México: UNAM.
- Blanco, M., Simonetti, L., & Rivera, O. (2003). *Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments* .
- Bruno, G., Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra, B. M., Catalano, R., & González, B. (2014). *repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.106/j.smallrumres.2014.04.002>.
- Cerbón, D. (1995). *recuperación de embriones en ovejas superovuladas inseminadas intrauterinamente o por monta natural*. D.F.: Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.
- De Tassigny, X., & Colledge, W. (2010). The role of Kisspeptin Signaling in reproduction. *Physiology*, 207-217.
- Dowd. (1999). The control of corpus luteum function in domestic ruminants. *Oxford Reviews of reproductive biology*(13), 203-237.
- Driancourt, R. (1987). Ovarian features contributing to the variability of PMS G-induced ovulation rate in sheep. *Reprod. Fertil*(80), 207-212.

- Edgar, P. R. (2016). evaluación de tres protocolos de sincronización de celo e inseminación artificial a tiempo fijo (IA. *Tesis de Grado*, 93.
- Evans, G., & Armstrong, W. (1984). *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza, España.
- Gallardo. (2001). *Instituto Nacional de tecnología agropecuaria. estación experimental agropecuaria*. Rafaela Santa Fe, Argentina.
- Gherardi. (2001). The effect of season on the ovulatory response of Merino ewes to serum from pregnant mares. *Reprod. Fertil*, 425-429.
- Gibbons, A., & Cueto, M. (2013). *Transferencia de Embriones en Ovinos*. Obtenido de http://produccionbovina.com/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/01-transferencia_embryones.pdf
- Gibbons, S. (1995). *Transferencia de embriones en Ovinos y Caprinos*. Bariloche, Argentina: INTA.
- Gordon. (1996). *Reproduction in Cattle & Buffaloes* (Vol. IV). CAB.
- Greve. (2003). Producción de ovinos en el contexto del Mercosur. *2° Simposio nacional de mejoramiento animal*, 19-27.
- Hafez, E. (2000). *Producción e inseminación artificial en animales domésticos* (Sexta ed.). México: Interamericana.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (Séptima ed.). D.F., México: McGraw-Hill.
- Hincapié. (2004). *Anatomía y fisiología de los animales domésticos*. Litocom.
- Huanca. (2008). *Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y la producción de embriones en ovinos*.
- INE, I. N. (2008). *Encuesta Nacional Agropecuaria - ENA*. La Paz, Bolivia.
- International Embryo Transfer Society, I. (s.f.). *Manual of the International Embryo Transfer Society* (Segunda ed.). Estados Unidos: Champaign.
- Jabbour. (1991). Ovarian and endocrine response of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. *Anim. Reprod. Sci.*(26), 93-106.
- Jiménez. (2009). *Biología de la reproducción ovina. Científico técnica Calle* (Tercera ed.).

- Kelly. (1997). Superovulation in cattle; effect of FSF type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim. Reprod. Sci*(46), 1-14.
- Liu, C. A. (2007). Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod. Fertil Dev.*(2), 345-350.
- Mariaca, R. (2015). PDTI. *Plan de desarrollo territorial institucional municipio de San Borja*, 160.
- Mc Kelvey, W., Robinson, J., Aitken, R., & Robertson, I. (1986). repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology*(25), 855-865.
- Mossa, F., Duffy, P. N., Lonergan, P., & Evans, A. (2007). *Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes*. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.016>
- Mueller. (2008). Introducción a la producción ovina Argentina. *Corriedale Anuario*, 14-20.
- Quiroga, B. (2005). La ganadería como actividad sustentable en comunidades campesinas de Coro Coro prov. Pacajes del Dpto. La Paz. Tesis de Grado, Univ. Católica de Temuco Chile.
- Ramon. (2003). *Evaluación ultrasonográfica de la dinámica folicular en ovejas Criollas y rodeau en clima templado* . Universidad Autónoma de Chapingo. Tesis de maestría en ciencias del Departamento de Zootecnia .
- Rojas. (2003). Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de ovejas. *Pelibuey Veterinaria*(34), 225-233.
- Smith, J., & Steiner, R. (2006). Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54.

ANEXOS



Fuente: Reporte Fotográfico (2019).

Anexo 1. Ovinos donadoras de embriones.



Fuente: Reporte Fotográfico (2019).

Anexo 2. Hormona gonadotropina Coriónica Equina (eCG)



Fuente: reporte fotográfico (2019).

Anexo 3. Aplicación de Hormona eCG.



Fuente: reporte fotográfico (2019).

Anexo 4. Tricotomía de donadora de embriones



Fuente: Reporte Fotográfico (2019).

Anexo 5. Camilla Reclinable



Fuente: reporte Fotográfico (2019).

Anexo 6. Material Quirúrgico.



Fuente: reporte Fotográfico (2019).

Anexo 7. Extracción de Cuernos Uterinos.



Fuente: Reporte Fotográfico (2019).

Anexo 8. Conteo de Numero de Cuerpos Lúteos.



Fuente: Reporte Fotográfico (2019).

Anexo 9 Proceso de Colección de Embriones.



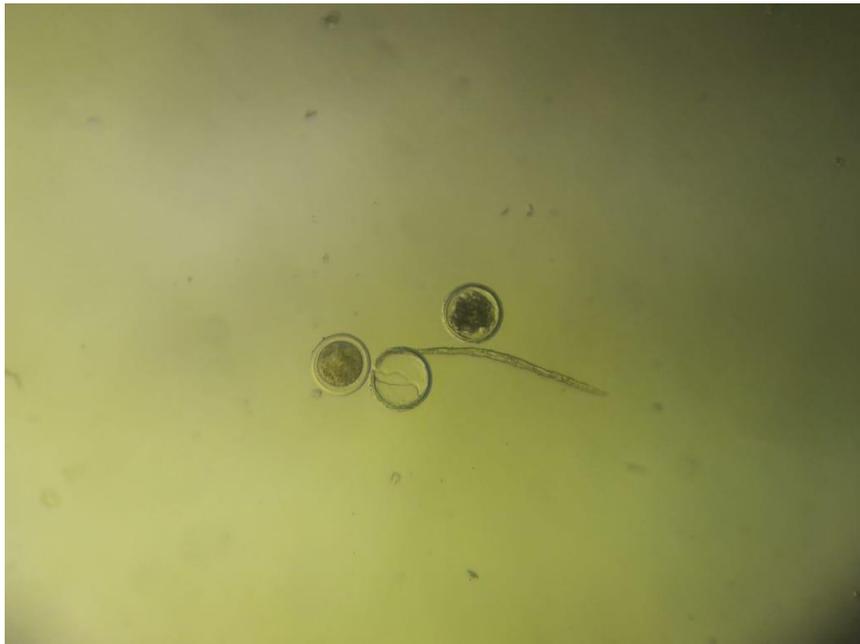
Fuente: Reporte Fotográfico (2019).

Anexo 10. Búsqueda y clasificación de embriones en estereoscopio



Fuente: Reporte Fotográfico (2019).

Anexo 11. Clasificación de embriones por su morfología



Fuente: Reporte Fotográfico (2019).

Anexo 12. Embriones de Diferentes Categorías

Anexo 13. Costos

Material en general	Materiales	unidad	Cantidad	Costo unitario en Bs.	Costo total (Bs)
	esponjas intravaginales		8	16	128
	sonda Foley de 2 viales		4	100	400
	Termómetro		1	125	125
	placas Petri 4 a 6 pocillos		130	8	1040
	aplicador de esponjas		155	1	155
	Jeringas		2	50	100
	Algodón	libra	2	25	50
	Gasa		6	10	60
	jabón carboxílico		2	18	36
	catgut crómico de 000		8	18	144
	catgut crómico de 000		8	18	144
	catgut crómico de 0		8	18	144
	hojas de bisturí		16	2.5	40
	tijera de esquila		1	50	50
	basurero		1	20	20
	suero fisiológico	litro	3	15	45
	penicilina procaico en polvo		4	50	200
	promacil		2	80	160
	lidocaína		4	25	100
	alcohol	litro	1	75	75
	Iodo	litro	2	85	170
	eCG		2	400	800

	prostaglandina		4	125	500
	benzoato de estradiol		2	50	100
	GnRH		2	160	320
	Xilacina		2	50	100
	vitamina K3		1	150	150
	vitamina ADE		1	50	50
	camilla reclinable		1	650	650
	guantes látex	caja	1	80	80
TOTAL MATERIALES					4142

Fuente: elaboración propia (2019)