

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS**

**INDUCCIÓN DE DOBLE CONCEPCIÓN Y GESTACIÓN MEDIANTE
LA TRANSFERENCIA DE UN SEGUNDO EMBRIÓN IPSILATERAL
O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO EN VACAS
PREVIAMENTE INSEMINADAS**

**JAHIR OSVALDO JAÉN SÁNCHEZ
8-783-1659**

**DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

2010

**INDUCCIÓN DE DOBLE CONCEPCIÓN Y GESTACIÓN MEDIANTE
LA TRANSFERENCIA DE UN SEGUNDO EMBRIÓN IPSILATERAL
O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO EN VACAS
PREVIAMENTE INSEMINADAS**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS**

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O
PARCIAL DEBE SER OBTENIDA EN LA FACULTAD DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS**

APROBADO:

ING. PEDRO GUERRA

DIRECTOR

ING. RODERICK GONZÁLEZ

ASESOR

LIC. CARLOS SALDAÑA

ASESOR

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2010

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios ante todo por haberme dado la vida, salud y fuerza para poder alcanzar una de mis más preciadas metas, la culminación de mis estudios universitarios.

A mis padres Maritza de Jaén, Rafael Jaén, a mis hermanos Joel Jaén, y Maycol Jaén por su incondicional apoyo, por sus consejos y perseverancia y larga espera.

Al profesor y director de mi tesis Ingeniero Pedro Guerra M, por su asesoramiento y apoyo en la realización de este documento.

A los miembros del comité de tesis, el Ingeniero Roderick González y el Licenciado Carlos Iván Saldaña por sus sugerencias brindadas.

Especial Agradecimiento al profesor y amigo Ingeniero Roderick González por su enseñanza, contribución y sabios consejos para la culminación de este trabajo.

Al ingeniero Raúl de León por su contribución y atinados consejos, a la Ingeniera Migdalia, al Técnico Luis Carreño y a mi compañera Kristel Flores por su valiosa colaboración para la culminación de este trabajo.

A mi familia en general, porque sus consejos y apoyo siempre han sido de gran importancia para mi. A todos, mil gracias, por el apoyo brindado, Dios los bendiga.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo especialmente a mi hermosa Hija Katherine Michelle Jaén Pérez, esperando que te sirva de inspiración en tu vida futura Hija.

A mi padre Maritza de Jaén y Rafael Jaén esperando que esto los llene de orgullo y mucha alegría.

Dedico este trabajo de manera muy especial a mi esposa Yanitza Pérez por su amor brindado e incondicional apoyo y larga espera.

A mis hermanos Joel Jaén y Maycol Jaén esperando que siempre luchen por sus mas anheladas metas y que no importa la circunstancia que se les presente nunca estarán solos confíen solo en Dios y verán.

INDUCCIÓN DE DOBLE CONCEPCIÓN Y GESTACIÓN MEDIANTE LA TRANSFERENCIA DE UN SEGUNDO EMBRIÓN IPSILATERAL O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO EN VACAS PREVIAMENTE INSEMINADAS

Jaén, J.O. 2010. Inducción de doble concepción y gestación mediante la transferencia de un segundo embrión ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo en vacas previamente inseminadas. Tesis Ingeniero Agrónomo Zootecnista Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá. Chiriquí, Panamá. 73 p.

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el efecto del sitio de depósito (T_1) ipsilateral o (T_2) contralateral al cuerpo lúteo de un segundo embrión en vacas previamente inseminadas sobre la tasa de preñez y de gestaciones dobles, se utilizaron 20 hembras Brahman, las cuales se dividieron en tres grupos. Se sincronizó con cloprostenol, luego se inseminaron los animales con presencia de celo. Siete días después de haber sido inseminadas se procedió a trasplantar los embriones (FIV) en estado de blastocito en forma ipsilateral y contralateral al cuerpo lúteo; 30 días después de inseminados los animales se procedió a tomar las primeras muestras por ultrasonografía tras rectal para determinar si la concepción doble se mantenía o hubiera presencia de reabsorción embrionaria, luego se tomaron muestras a los 60 y 90 días de gestación. Se encontró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) resultando el T_2 con el mayor porcentaje de preñez con 50%. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa para el efecto de los periodos ni la interacción tratamiento por periodo ($p > 0.05$). En cuanto al porcentaje de gestaciones dobles alcanzadas estas representaron un 83.3% del total de gestaciones obtenidas. De éste 83.3% el 50% de gestaciones dobles se obtuvieron en transferencia contralateral y el 33.3% en la transferencia ipsilateral. De acuerdo a lo descrito, se concluye que la transferencia de un segundo embrión al cuerno uterino contralateral de vacas previamente cubiertas es el método más efectivo de inducción de doble gestación.

PALABRAS CLAVES: ipsilateral, contralateral, blastocito, cuerpo lúteo, embriones, gestación, celo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
PAGINA DE TÍTULO	i
PAGINA DE APROBACIÓN	ii
AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	v
RESUMEN	vi
INDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del Problema.....	3
1.2. Antecedentes.....	3
1.3. Justificación.....	4
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Generales.....	5
1.4.2. Específicos.....	5
1.5. Hipótesis.....	6
1.6. Alcances y Limitaciones del Estudio.....	7
II. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Fisiología de la Reproducción Bovina.....	8
2.1.1. Fisiología Hormonal.....	8
2.1.2. Activación de Mecanismos Luteolíticos.....	14
2.1.3. Liberación Tónica de la LH y FSH.....	15
2.1.4. Estimulación Ovárica y Ovulación Múltiple.....	15

2.1.4.1. Los Ovario.....	15
2.1.4.2. La Progesterona.....	17
2.1.5. Fase Periovulatoria (éstro y metaestro).....	18
2.1.6. Fase Lúteal (diestro).....	19
2.1.7. Regresión del Cuerpo Lúteo.....	20
2.1.8. Reinicio de la Actividad Postparto.....	23
2.2. Sincronización del Estro entre Donadoras y Receptoras.....	24
2.2.1. Sincronización de Estro y Ovulación.....	25
2.2.1.1. Prostaglandina.....	26
2.2.2. Selección y Ppreparación de Receptoras.....	27
2.3 Búsqueda de Embriones.....	28
2.3.1. Maduración del Ovulo.....	28
2.3.2. Crecimiento del Ovocito.....	28
2.3.3. Preparación del Ovocito para la Fertilización.....	29
2.4 Clasificación Morfológica de los Embriones.....	30
2.4.1. Transferencia de Embriones.....	32
2.4.2. Desarrollo Post-transplante del Embrión.....	34
2.4.3. Eficiencia Reproductiva de la Técnica de Transplante de Embriones.....	36
2.5. La inseminación Artificial.....	37
2.5.1. Ventajas de la Inseminación Artificial.....	38
2.6. Inducción de Doble Gestación.....	40
2.6.1. Por Transferencia en Vacas Pre Inseminadas.....	40
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1. Ubicación y Caracterización del Área Experimental.....	46
3.2. Animales Experimentales y Manejo.....	46
3.3. Tratamientos.....	48
3.4. Variable de Respuesta y Periodo de Evaluación.....	48
3.5. Diseño Experimental y Modelo Estadístico.....	49

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1. Porcentaje de Concepción (evaluadas a los 30 días).....	50
4.2. Porcentaje de Gestación (evaluadas a los 60 días).....	56
4.3. Porcentaje de Gestaciones Simple y Dobles (evaluadas a los 90 días).....	57
V. CONCLUSIÓN	59
VI. RECOMENDACIONES	60
VII. BIBLIOGRAFÍA	61

INDICE DE CUADROS

Nº	TÍTULO	PÁGINA
CUADRO I.	TASA DE PREÑEZ Y DE GESTACIONES DOBLES, A LOS 60 Y 90 DÍAS POST-CUBIERTA E INOVULACIÓN DE UN SEGUNDO EMBRIÓN CONGELADO-DESCONGELADO DEPOSITADO IPSILATERAL O CONTRALATERALMENTE AL CUERPO LÚTEO A LOS 7 DÍAS POS CUBIERTA EN VACAS.....	44
CUADRO II.	ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA MÁXIMA PROBABILIDAD DE CHI CUADRADO.....	50
CUADRO III.	TASA DE CONCEPCIÓN A LOS 30 DÍAS IPSILATERAL O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO.....	52
CUADRO IV.	TASA DE GESTACIÓN A LOS 60 DÍAS IPSILATERAL O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO.....	56
CUADRO V.	TASA DE GESTACIÓN SIMPLE Y DOBLE A LOS 90 DÍAS IPSILATERAL O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO.....	57

INDICE DE ANEXOS

Nº	TÍTULO	PÁGINA
ANEXO 1.	PALPACIÓN DE CUERPO LÚTEO EN VACAS SELECCIONADAS.....	68
ANEXO 2.	... OBSERVACIÓN DE VACAS EN CELO.....	68
ANEXO 3.	INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE VACA EN CELO.....	69
ANEXO 4.	CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES DE FIV.....	69
ANEXO 5.	MATERIALES UTILIZADOS PARA TRANSFERIR LOS EMBRIONES.....	70
ANEXO 6.	TRASPLANTE DEL EMBRIÓN IPSILATERAL O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO.....	70
ANEXO 7.	DIAGNOSTICO DE CONCEPCIÓN Y GESTACIÓN POR ULTRASONOGRAFÍA TRANSRECTAL.....	71
ANEXO 8.	CONCEPCIÓN OBSERVADA A LOS 30 DÍAS.....	72
ANEXO 9.	DOBLE GESTACIÓN OBSERVADA A LOS 60 DÍAS.....	73
ANEXO 10.	PREÑES OBSERVADA A LOS 90 DÍAS DE GESTACIÓN.....	73

I. INTRODUCCIÓN

Incrementar la tasa de parición y la tasa de destete es uno de los objetivos de la ganadería bovina a nivel mundial. Durante la última década se ha logrado notables avances en el conocimiento de la técnica de la inseminación artificial, transferencia de embriones, las funciones del cuerpo lúteo y su control neuroendocrino. Técnicas como el uso de hormonas han permitido el desarrollo de las tecnologías de sincronización del estro y la transferencia de embriones para la inducción de gestaciones múltiples. La eficiencia de los bovinos de carne está directamente relacionada a su producción y bajo costo. Por lo tanto, se vislumbra el aumento de la frecuencia de gestaciones múltiples como una forma de contribuir a aumentar esta eficiencia.

Entre los problemas reproductivos asociados a la gestación gemelar en vacas están mortalidad neonatal, retención placentaria y partos distócicos. Podrían ser solucionados estos problemas con un adecuado manejo, nutrición y supervisión de los terneros. Dickerson (1978), indicó que el mellizaje en bovinos es potencialmente importante para aumentar la eficiencia de la producción de carne de ganado vacuno, debido a los sobre gastos generales de mantenimiento de las vacas de un solo parto, el cual representa más del 50 por ciento de los costos totales de producción. Actualmente, la mayoría de la inducción de gestación múltiple en bovinos mediante la transferencia de un segundo embrión

al útero de vacas previamente inseminadas en centros de investigación, se realizan depositando el embrión en el cuerno uterino contralateral al cuerpo lúteo (Silva y col., 2000). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la transferencia embrionaria al cuerno ipsilateral, podría presentar ventajas comparativas al método contralateral, para lograr gestaciones dobles en este tipo de receptoras (Penny y col., 1995).

Países como los Estados Unidos, Irlanda, Francia y Australia han incursionado a la obtención de mellizajes por selección buscando incrementar los ingresos del sistema de cría bovina. En Panamá no existe experiencia reportada en la inducción de doble gestaciones mediante la transferencia de un segundo embrión, en forma ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo; en vacas previamente inseminadas. Por lo tanto, este estudio está enfocado a determinar el efecto del sitio de transferencia de un segundo embrión en forma ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo, sobre dobles gestaciones en vacas previamente inseminadas. De forma tal que se valide ésta herramienta biotecnológica como una forma de aumentar la disponibilidad de animales de alto valor genético y así se logra mejorar la eficiencia de los sistemas vaca-ternero.

1.1. Planteamiento del Problema

En el sistema de cría y ceba de panamá existe el ganado cebú como pie de cría, el cual ha mostrado una excelente adaptación a nuestras condiciones agroclimáticas. Sin embargo, su fertilidad, precocidad y calidad de carne lo castigan como un recurso genético para sistemas de producción. En este sentido la productividad de la vaca de cría en panamá es una de las más bajas dentro de las especies de interés zootécnico comparado con otros sistemas de producción animal (lechería especializada, avícola, y porcina).

Una posibilidad de aumentar la producción de animales de alta genética en panamá, es a través de la inducción de mellizos. Con este método se busca aumentar la tasa reproductiva en un hato y así incrementar los kilogramos de ternero destetados en vacas expuestas a toro incrementando la genética y sostenibilidad de la ganadería en panamá.

1.2. Antecedentes

Diversos investigadores señalan, que es posible obtener una tasa de preñez y una tasa de inducción de gestaciones de mellizos aceptable de 50 por ciento y 72 por ciento respectivamente, utilizando un procedimiento de transferencia unilateral de dos embriones producidos *in vitro* (Caballero, 2005). Por su parte Morris, (1984), indica que los partos dobles en el bovino son una característica que posee una baja heredabilidad (0,03) y repetibilidad (0,06). Las estimaciones de la frecuencia de nacimientos dobles varían entre un uno y cinco por ciento

dependiendo, principalmente de la raza, la edad y condiciones ambientales. De establecerse la gestación doble unicornual, las posibilidades de aborto serían mayores que si ésta fuera bilateral indica (Reichenbach y col., 1992), Sin embargo, Sreenan y Diskin (1986), señalan que no habría diferencia en el porcentaje de abortos presentados por vacas gestando mellizos unilateral o bilateralmente. Ha sido demostrado que es posible obtener una alta incidencia de gestaciones dobles al transferir dos embriones bilateralmente al útero de hembras receptoras (Rowson y col., 1971). Es poco probable que la transferencia contralateral de un segundo embrión a una hembra bovina previamente cubierta aumente la tasa de preñez alcanzada solamente con la inseminación artificial. En cambio, la técnica de transferencia ipsilateral aumentaría las probabilidades de sobrevivencia del embrión transferido, ya que si el embrión nativo no sobrevive, el transferido se encontrará en una ubicación muy adecuada con respecto al cuerpo lúteo (Penny y col., 1995).

1.3. Justificación

En Panamá se ha incrementado el uso de técnicas de biotecnologías; sin embargo, estas son costosas y de mediana a baja efectividad. Por lo tanto, es necesario encontrar y diseñar protocolos de utilización de estas técnicas que permitan aumentar los beneficios en la utilización de las mismas y que contribuyan a mejorar los beneficios económicos del sistema de producción. En este sentido, la inducción de gestación múltiple aumenta la disponibilidad de animales de alto valor genético, logrando mejorar la eficiencia de los sistemas de producción bovino.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Determinar el efecto de sitio de transferencia de un segundo embrión en forma ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo, sobre la tasa de concepción y gestaciones dobles en vacas previamente inseminadas.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar la viabilidad de la transferencia (ipsilateral o contralateral) de un segundo embrión sobre la tasa de concepciones dobles a los 30 días, en vacas previamente inseminadas.
- Determinar la viabilidad de la transferencia (ipsilateral o contralateral) de un segundo embrión sobre la tasa de gestaciones dobles a los 60 y 90 días, en vacas previamente inseminadas.
- Determinar el efecto del sitio de transferencia de un segundo embrión en forma ipsilateral o contralateral, sobre la tasa de concepción y gestaciones totales en vacas previamente inseminadas.

1.5. Hipótesis

Para Objetivo 1.

Ha: Existen diferencias significativas sobre la tasa de concepciones dobles a los 30 días, según sitio de transferencia de un segundo embrión en vacas previamente inseminadas.

Ho: No existen diferencias significativas sobre la tasa de concepciones dobles a los 30 días, según sitio de transferencia de un segundo embrión en vacas previamente inseminadas.

Para Objetivo 2.

Ha: Existen diferencias significativas sobre la tasa de gestaciones dobles a los 60 y 90 días, según sitio de transferencia de un segundo embrión ipsilateral o contralateral en vacas previamente inseminadas.

Ho: No existen diferencias significativas sobre la tasa de gestaciones dobles a los 60 y 90 días, según sitio de transferencia de un segundo embrión ipsilateral o contralateral en vacas previamente inseminadas.

Para Objetivo 3.

Ha: Existen diferencias significativas sobre la tasa de concepción y gestaciones totales, según sitio de transferencia de un segundo embrión ipsilateral o contralateral en vacas previamente inseminadas.

Ho: No existen diferencias significativas sobre la tasa de concepción y gestaciones totales, según sitio de transferencia de un segundo embrión ipsilateral o contralateral en vacas previamente inseminadas.

1.6. Alcances y Limitaciones del Estudio

La inducción de doble concepción y gestación permite aumentar la tasa de fertilidad y nacimientos vivos en un rebaño, aumentando el número de terneros por vaca y terneros destetados en un sistema vaca-ternero.

Dentro de las limitantes de este estudio estuvo la poca disponibilidad de animales receptores aptos para este estudio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Fisiología de la Reproducción Bovina

2.1.1. Fisiología Hormonal

La fisiología de la reproducción es considerada como el conocimiento que trata de los diferentes mecanismos a través de los cuales se logra la perpetuación de todas las especies. Estos procesos reproductivos envuelven patrones de considerable complejidad muy claros y definidos en la actualidad. La capacidad reproductiva de una hembra depende de cómo se llevan a cabo varios eventos fisiológicos: secreción hormonal, fertilización, implantación, formación del embrión, preñez y parto. La fertilidad puede ser interrumpida en cualquiera de los estadios de reproducción mencionados, los cuales son controlados fisiológicamente por el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios, la glándula adrenal y el tracto reproductivo (García, 1998). Sin embargo, Manrique (1990), indica que la fisiología de la reproducción es considerada como el conocimiento que trata de los diferentes mecanismos a través de los cuales se logra la perpetuación de todas las especies.

Hipotálamo

Histológicamente, el hipotálamo forma la base del cerebro y sus neuronas producen la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), esta glándula está compuesta de núcleos, células dispersas y axones, los cuales conectan una célula con la otra. Pero el elemento principal del hipotálamo desde el punto de vista reproductivo son las células neurosecretoras, las cuales se encuentran dispersas en núcleos. Estas parecen células endocrinas, debido a la presencia de gránulos secretorios compuestos por hormonas verdaderas, las cuales emigran a los axones para ser vertidas a las terminaciones nerviosas (Moreno y col., 2000). Mientras que Rosell (2004), indica que el hipotálamo representa un porcentaje pequeñísimo de la masa encefálica y constituye el centro de la actividad sexual que analiza y regula todos los estímulos de los receptores externos e internos de los órganos de los sentidos, según su intensidad y variabilidad. En este sentido este mismo autor señala que entre el hipotálamo y la adenohipófisis existe una conexión vascular particular denominada sistema porta hipotálamo-hipofisiaria, la cuál permite que las sustancias liberadas por el hipotálamo alcancen directamente la hipófisis sin pasar a la circulación periférica, también permite el flujo retrógrado de sustancias adenohipofisiarias, estableciendo así una retroalimentación de ondas corta hacia el hipotálamo. Manrique (1990), reporta que el comportamiento cíclico normal de la reproducción se debe, en gran parte, a la acción de la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) de la parte anterior de la hipófisis,

pero la liberación de estas hormonas depende de las áreas específicas del hipotálamo.

Hipófisis

La hipófisis está formada por una parte anterior o adenohipófisis y una posterior o neurohipófisis. La adenohipófisis produce varios tipos de hormonas, de las cuales la FSH y LH cumplen un papel relevante en el control neuroendócrino del ciclo estral (Moreno y col., 2000). Estos mismo autores mencionan que la FSH es la responsable del proceso del crecimiento y maduración folicular mientras que la LH interviene en el proceso de ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Estas dos hormonas son secretadas a la circulación en forma de pulsos y son reguladas por dos sistemas, el tónico y el cíclico. El sistema tónico produce el nivel basal circulante, siempre presente de hormonas hipofisiarias las cuales promueven el desarrollo de los elementos germinales y endócrinos de las gónadas. El sistema cíclico opera más agudamente, siendo evidente por solo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de la hembra. El modo cíclico tiene por función primaria causar la ovulación. Por su parte, McDonald (1981), reporta que la hipófisis o también conocida como glándula pituitaria esta formada por la influencia de rudimentos embriológicos primarios, uno de los cuales procede del encéfalo y el otro del epitelio de la cavidad bucal, los cuales se convierten, respectivamente, en neurohipófisis y adenohipófisis que descansa en una región del esferoide conocida como silla turca.

Hormona Folículo Estimulante

Hafez (1989), menciona que la FSH es una hormona producida por la hipófisis, es una glicoproteína cuya vida media oscila entre dos y cuatro horas. En la hembra la FSH estimula el crecimiento y maduración de los folículos de Graff en el ovario y por lo tanto representa el factor principal para inducir en crecimiento en los ovarios. Este mismo autor señala que la FSH no provoca la secreción de estrógeno a partir del ovario por sí misma, pero en presencia de LH estimulará la producción de estrógenos tanto del ovario como del testículo. En el macho, la FSH actúa en las células germinales de los túbulos seminíferos y aumenta el tamaño de los testículos. En la actualidad, la FSH se utiliza principalmente en la estimulación del desarrollo folicular para inducir ovulaciones múltiples. Sin embargo, Holy (1970), señala que la FSH fue aislada de la hipófisis del carnero y más tarde del cerdo y del caballo. La hipófisis de la yegua es la fuente más rica de esta hormona. Este mismo autor indica que la función más importante de la FSH en el ganado vacuno no es estimular el crecimiento y maduración de los folículos en el ovario. Ella por sí sola no puede cumplir su tarea si no que requiere de la colaboración de la LH.

Estudios realizados por Zeleznik y col. (1974), sugieren que los efectos de la FSH sobre el ovario está mediado sobre todo por las células de la granulosa. Este mismo autor señala que la FSH puede provocar la maduración de las células de la granulosa con objeto de que los folículos puedan responder a la LH endógena que se segrega durante el ciclo estral. En otro sentido Steinberger y

col. (1974), mencionan que la FSH es necesaria para los pasos finales de la maduración espermática en machos. Hansson y col. (1974), han postulado que la FSH estimula la producción de las células de Sertoli de una proteína fijadora de andrógenos, que aumentan la fijación y acumulación de andrógenos en el interior del tubo seminífero.

Funciones de la Hormona Folículo Estimulante

- Estimula el crecimiento y desarrollo de folículos
- Interviene en el crecimiento testicular
- Ayuda en la producción de andrógenos y estrógeno
- Interviene en la gametogénesis masculina
- Se utiliza para inducir la superovulación

Hormona Lúteonizante

Estudios realizados por Hafez (1989), señalan que la hormona lúteonizante es una glucoproteína compuesta de una subunidad alfa y otra beta. Con un peso molecular de 30,000 daltons y una vida media de 30 minutos. Esta hormona tiene como función que los niveles tónicos o basales de LH actúan con FSH para inducir la secreción de estrógenos de los folículos de Graff agrandados a la elevación preovulatoria de la LH. Lo cual coincide con lo encontrado por Rosell (2004), el cual reporta que LH considerada como responsable de la maduración y la ovulación del folículo de de Graff y de la formación y el mantenimiento del cuerpo lúteo, es también una glicoproteína, sintetizada por las células basófilas

de la hipófisis a semejanza de la FSH, pero a diferencia de aquella su actividad biológica esta representada por la fracción proteica y su vida media en sangre es solo de alrededor de 35 minutos. Este mismo autor indica que las concentraciones de LH son relativamente bajas durante la fase luteal del ciclo, pero una descarga de esta en forma de un gran pico preovulatorio se produce de 24-30 horas antes de la ovulación, esta coincide aproximadamente con el comienzo del celo.

En algunas especies hay evidencia clara de que la LH es liberada en episodios o pulsos a lo largo del ciclo estral y en muchas está bien establecido que es necesaria la presencia de LH para mantener la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo.

Funciones de la Hormona Lúteonizante

- Estimula la ovulación y la formación del cuerpo lúteo
- Estimula la formación de los cuerpos de Leydig para la producción de testosterona
- Estimula la producción de andrógenos
- Estimula la maduración de folículos en desarrollo

2.1.2. Activación de Mecanismos Lúteolíticos

La interacción entre la progesterona, los estrógenos y la oxitocina y sus respectivos receptores entre otros factores, permiten que el epitelio endometrial produzca y libere a la vena uterina media el principal agente inductor de la lisis del cuerpo lúteo la prostaglandina $F2\alpha$, esta pasa a la arteria ovárica por un mecanismo de difusión y por contracorriente llega al cuerpo lúteo, en donde va a cumplir con su acción luteolítica la cual consiste en desencadenar un proceso de muerte celular programada denominada apoptosis de la células del cuerpo lúteo (Barner, 2000). En este sentido Hafez (2000) y Rodríguez (2001), reportan que la disminución en la concentración de progesterona durante el ciclo estral, es la causante de que se lleve a cabo la producción uterina de prostaglandina $F2\alpha$ desencadenando la activación de mecanismos luteolíticos, ya que la acción de la progesterona hace que se aumente los niveles de fosfolípidos, así como la función de la prostaglandina sintetasa. estos mismos autores reportan que la concentración pulsátil de la prostaglandina $F2\alpha$ aumenta en la vena uterina durante el proceso de luteolisis, encontrándose liberación de hormonas en forma de pulsos, cinco a ocho en un espacio de seis a ocho horas, produciendo la inminente regresión del cuerpo lúteo entre los días 16 a 19 del ciclo estral. Esta acción luteolítica de la prostaglandina $F2\alpha$ se da porque ocasiona vasoconstricciones del flujo sanguíneo que llega al cuerpo lúteo.

2.1.3 Liberación Tónica de la LH y FSH

McDonald (1981) y Hafez (1989), señalan que la LH y la FSH séricas se liberan en una forma tónica o basal, tanto en hembras como en machos. Las concentraciones tónicas de LH y FSH están controladas por un mecanismo de retroalimentación negativa a partir de las gónadas. Las cifras tónicas de la LH no son estacionarias, sino que muestran oscilaciones cada hora. Las concentraciones séricas tónicas de la LH se encuentran elevadas después de la castración tanto en machos como en hembras. La concentración aumenta de LH y FSH después de una gonadectomía, se debe a la carencia de una retroalimentación negativa a partir de los esteroides gonadales ubicados en el centro de control de secreción tónica de LH localizado en el hipotálamo

2.1.4. Estimulación Ovárica y Ovulación Múltiple

2.1.4.1. Los Ovarios

Syntex (2005) y Rosell (2004), señalan que los ovarios son glándulas exócrinas (liberan óvulos) y endócrinas (secretan hormonas). Entre las hormonas que producen los ovarios podemos mencionar a los estrógenos, la progesterona y la inhibina.

Los estrógenos o hormonas esteroideas, son producidos por el folículo ovárico y tienen acciones sobre los distintos órganos blanco como son las trompas de

Falopio, el útero, la vagina, la vulva y el sistema nervioso central, en el cual estimulan la conducta de celo y el hipotálamo donde ejercen un "feedback" negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico.

Por otro lado Manrique (1990), indica que los ovarios son órganos esenciales en la reproducción de la hembra y tiene dos funciones principales: la endocrina, a través de la cual se elaboran las hormonas y la citogénica, por su producción de óvulos a través de los folículos.

En todos los animales, los ovarios son pares, es decir en número de dos y su tamaño depende de la edad, especie y estadio reproductivo del animal. El desarrollo de sus componentes histológicos está bajo el control de las hormonas de la hipófisis.

Este mismo autor menciona que los ovarios son ovoides, pero su forma varía de acuerdo con estructuras diferentes durante el ciclo estral, como los folículos y el cuerpo lúteo o cuerpo amarillo. La superficie del ovario está cubierta por la túnica albugínea que es una formación densa de tejido conjuntivo. El ovario está formado de una parte cortical y una zona medular. Se diferencian una de la otra no solamente por la estructura sino por sus funciones.

2.1.4.2. La Progesterona

Hernández y Quintero (1998), indican que la progesterona es el principal producto de secreción del cuerpo lúteo, siendo responsable de la preparación del útero para el establecimiento y mantenimiento de la gestación. En la mucosa del oviducto y del útero, la progesterona estimula la secreción de sustancias que nutrirán al embrión hasta que este comience a hacerlo a través de la placenta. Además, la progesterona evita las contracciones del útero, cierra el cérvix y modifica las características del moco cervical, volviéndolo mas viscoso, lo que evita el paso de agentes extraños al interior del útero. Por otra parte, la progesterona estimula el desarrollo del sistema alveolar de la glándula mamaria, preparándola para la síntesis y secreción de leche. Estos mismos autores indican que La progesterona regula los cambios que deben ocurrir en el oviducto y útero para que el embrión se desarrolle. En este sentido Martal y Cerdard (1993) citado por Rosell (2004), señalan que la progesterona es producida por el cuerpo lúteo al principio de la preñez y es esencial para el mantenimiento de la gestación, se encuentra en pequeñas cantidades en la corteza adrenal y en los testículos. Se produce en la placenta de algunos animales, pero en determinadas especies (yegua y oveja) al final de la gestación dicha producción alcanza gran importancia.

Estos mismos autores mencionan que la progesterona considerada la hormona de la preñez, es un factor de primera necesidad para el mantenimiento de la gestación. Después de producida la fecundación, esta hormona inhibe la

actividad contráctil del útero y estimula el desarrollo de sus glándulas. También provoca la mucificación del epitelio vaginal y ejerce acción hiperplásica sobre los acinis glandulares de la ubre.

2.1.5. Fase Periovulatoria Estro y Metaestro

Syntex (2005), reporta que esta fase comienza con la receptividad al macho, la vaca se deja montar por vacas y toros, e involucra todos los cambios que permiten la ovulación y comienzo de la formación del cuerpo lúteo. Durante el éstro, cuya duración es de 18 ± 6 horas, la vaca manifiesta inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y pierde el apetito; en el caso de las vacas lecheras, se reduce su producción de leche. Las vacas presentan descarga de mucus con mínima viscosidad, cuyo olor atrae y excita al toro (presencia de feromonas), edema de vulva y en el útero se produce un aumento del tono miometrial, detectado fácilmente por palpación transrectal. Durante esta fase, los estrógenos en altas concentraciones alcanzan el umbral de estimulación del centro cíclico hipotalámico, estimulando a las neuronas hipotalámicas a producir el pico de GnRH y en consecuencia el pico de LH. Con respecto a la FSH, disminuye su secreción, posteriormente 4 a 12 horas después de la onda de LH, se incrementan la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH, relacionándose esto con la primera onda de crecimiento folicular.

Luego de 12 a 24 horas de comenzado el celo, el sistema nervioso de la vaca se torna refractario al estradiol y cesan todas las manifestaciones psíquicas del

mismo. El período inmediato a la finalización del celo, es el metaestro seis días. En este período ocurre la ovulación de la vaca a diferencia de las otras especies que lo hacen durante el celo, y comienza la organización celular y desarrollo del cuerpo lúteo. En otro sentido Portillo (2005), indica que el metaestro es el período entre la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo funcional y su duración es entre tres y cinco días. La ovulación ocurre entre 24 y 36 horas del inicio del celo en el ganado europeo. En forma similar, la ovulación en el ganado cebú ocurre alrededor de 25 horas después del inicio del celo. Este mismo autor señala que esta etapa el folículo recientemente ovulado sufre cambios celulares y estructurales que resultan en la formación del cuerpo lúteo. El nuevo cuerpo lúteo es rápidamente invadido por vasos sanguíneos los cuales suplen los sustratos necesarios para la producción de progesterona.

2.1.6. Fase Lútea Diestro

McDonald (1981) y Syntex (2005), indican que el diestro es el periodo más largo del ciclo estral. Aun cuando la vaca no quede preñada, el cuerpo amarillo se transforma en un órgano funcional que elabora grandes cantidades de progesterona y algún estrógeno que ingresa en la circulación general y afecta el desarrollo de las glándulas mamarias y el crecimiento del útero. El miometrio se hipertrofia por la influencia de la progesterona y las glándulas uterinas secretan un material viscoso espeso que servirá de nutrición al cigoto. En este sentido Portillo (2005), señala que el diestro se caracteriza por la presencia de un cuerpo lúteo funcional y el incremento en las concentraciones de progesterona,

siendo el estadio mas largo del ciclo estral con una duración entre 10 y 14 días. Este periodo finaliza con la secreción de prostaglandina $F2\alpha$ del útero, lo cual resulta en la regresión del cuerpo lúteo y en la reducción de la producción de progesterona. En caso que el óvulo resulte fertilizado, el cuerpo lúteo se mantendrá durante toda la preñez. Por el contrario, si el óvulo no es fertilizado, el cuerpo lúteo permanece funcional hasta el día 17 ó 18 del ciclo cuando ocurre la regresión y por lo tanto permite el inicio de un nuevo ciclo estral.

2.1.7. Regresión del Cuerpo Lúteo

Estudios realizados por Hernández y Quintero (1998), indican que el cuerpo lúteo es de los pocos órganos que tienen una fase de crecimiento, desarrollo y regresión. La regresión lútea es ocasionada por la liberación pulsátil de prostaglandina $F2\alpha$, la cual actúa sobre el cuerpo lúteo ocasionando cambios que conducen a su degeneración. El mecanismo por el cual se inicia la síntesis y secreción de la prostaglandina $F2\alpha$ depende de una interacción entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y el útero.

Los estrógenos ováricos desempeñan un papel importante en el inicio de la secreción de prostaglandina $F2\alpha$. La administración de estradiol exógeno en el diestro tardío puede provocar la luteólisis debido a que permite que la oxitocina estimule en el endometrio la secreción de prostaglandina $F2\alpha$, esto se debe a que el estradiol estimula la síntesis de receptores para oxitocina. Estos mismos autores señalan que el estradiol estimula en el endometrio la producción de

enzimas como la fosfolipasa A y la ciclooxigenasa, que son indispensables para la síntesis de prostaglandina F_{2α}.

La oxitocina es una de las tres principales hormonas implicadas en el control de la secreción de prostaglandina F_{2α}, la secreción de la prostaglandina F_{2α} depende de la unión de la oxitocina a sus receptores en el endometrio. Estudios realizados por estos autores reportan que a partir del día 13 del ciclo en la oveja y 16 en la vaca y cabra, aumenta el número de receptores de oxitocina en el endometrio y este evento determina el momento en que inicia la luteólisis. En este sentido mencionan que si los receptores aparecen demasiado temprano la regresión del cuerpo lúteo se adelanta, como ocurre en las hembras que desarrollan cuerpo lúteos de vida corta en la primera ovulación de la época reproductiva del posparto y en la pubertad.

Durante un ciclo normal la progesterona ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de prostaglandina F_{2α}, debido a que inhibe la formación de receptores para estradiol en el endometrio y por lo tanto el estradiol no puede estimular la síntesis de receptores a oxitocina. Este efecto de la progesterona depende del tiempo de exposición y de las concentraciones de esta hormona, siendo más efectivo a concentraciones más altas. Sin embargo, McCracken y col. (1984), propusieron un modelo que explica el mecanismo por el cual se establece la secreción pulsátil de prostaglandina F_{2α}, la neurohipófisis libera oxitocina en forma pulsátil y uno de estos pulsos estimula la liberación de prostaglandina

F2 α , este primer pulso de prostaglandina F2 α el cual es de baja magnitud, estimula la liberación de oxitocina de origen lúteo. Así se establece un mecanismo de retroalimentación positivo entre éstas dos hormonas. Estos mismos autores señalan que la oxitocina estimula la liberación de prostaglandina F2 α , pero al mismo tiempo la alta concentración de oxitocina provoca la pérdida de la sensibilidad del endometrio, con lo que después de un tiempo deja de secretar prostaglandina F2 α . El intervalo entre pulsos de prostaglandina F2 α está determinado por la pérdida de la sensibilidad del endometrio a la oxitocina y por el tiempo que tarda en recuperarla. Así, el mecanismo de retroalimentación positiva se interrumpe y vuelve a establecerse hasta que pasan seis horas, tiempo suficiente para que el endometrio recupere la sensibilidad a la oxitocina; por este motivo los pulsos de prostaglandina F2 α se presentan con un intervalo de seis a ocho horas. Por otra parte Zollers y col. (1989), demostraron que vacas posparto destinadas a formar cuerpos lúteos de vida corta liberaron de prostaglandina F2 α cuando fueron estimuladas mediante la administración de oxitocina en el día cinco postovulación, lo que confirma la aparición temprana de receptores funcionales para oxitocina en este tipo de animales. El útero que no ha sido expuesto previamente a progesterona secreta prematuramente prostaglandina F2 α en la primera fase lútea

2.1.8. Reinicio de la Actividad Postparto

Según investigaciones realizadas por Hafez (1987); Ascoli y Segaloff (1996) y Cunningham (1997), encontraron que pasados aproximadamente cinco días del parto, se restablecen los ciclos reproductivos. Aumenta la liberación de GnRH que da lugar a un aumento marcado de FSH seguido de la liberación pulsátil de LH que genera la activación folicular y secreción de 17- β estradiol.

En este sentido Syntex (2005), señala que la actividad folicular está normalmente ausente en los primeros 10 días posteriores al parto, pero normalmente comienza rápidamente posterior a éste momento. En vacas lecheras bien alimentadas, la actividad de onda folicular se acompaña por dominancia folicular, entonces es común encontrar presentación de celo y ovulación desde los 10 días de paridas, en vacas de producción de carne es similar. Este mismo autor señala que el reinicio de las ondas foliculares ha sido observada a los 10 días pasado el parto, sin embargo la ovulación ocurre más tarde que en la vaca de leche (media 30,6 días). En las vacas con condición corporal no deseable y pobremente alimentadas, la actividad folicular también se reinicia en este momento pero la dominancia puede estar ausente por varias semanas. Nett (1987), citado por Henao (2001), señala que durante la gestación y después del parto las vacas tienen cambios fisiológicos que desfavorecen el reinicio temprano de la actividad ovárica necesaria para la manifestación de estro, la ovulación y la nueva concepción y deben restablecer su equilibrio neuroendocrino antes de que esto suceda.

2.2. Sincronización del Estro entre Donadoras y Receptoras

La capacidad de la prostaglandina exógena para causar la regresión del cuerpo lúteo presente en el ovario de hembras que están ciclando, además de la inducción de un estro fértil en un periodo de tres a cinco días, ha facilitado su uso en programas de sincronización (Salverson y col., 2002).

Para la transferencia de embriones con buenos resultados es necesaria la sincronización entre la etapa del huevo y el sistema reproductor de la hembra receptora. Por lo general esto se logra seleccionando receptoras que estén en estro en el mismo momento en que las donadoras estén ya sea naturalmente o como resultado de la sincronización del estro (Rabiee y col., 2005). De esta manera Hafez (1989), señala que para resultados óptimos la hembra receptora debe de estar en estro dentro de 12 horas anteriores o posteriormente al estro de la donadora.

Los índices de preñez disminuyen drásticamente si la diferencia es mayor a 24 horas en vacas. Las receptoras de embriones, que han sido congelados o almacenados a baja temperatura deben seleccionarse para que estén en sincronía fisiológica con la etapa de desarrollo del embrión. Por tanto, si se han congelado los embriones durante dos días, deberán ser trasferidos a receptoras que estuvieron en estro dos días después de la donadora.

2.2.1. Sincronización de estro y ovulación

Cole y Cupps (1972), indican que varios de los procesos de reproductivos son susceptibles de un cierto grado de control artificial. Entre ellos se incluye el momento de la ovulación y el estro, el número de óvulos producidos y el momento del parto. Además y en asociación con dicho control, pueden emplearse ciertos procedimientos instrumentales del tipo de transferencia ovular, inseminación artificial y almacenaje de embriones congelados. Hansel y Convey (1983), citado por Hafez (1989), encontraron que en hembras domésticas ciclando se controla el momento del estro por la secreción de progesterona del cuerpo lúteo, la cual ejerce una retracción negativa en la secreción de LH por lo que los eventos endocrinos que conducen a la maduración de los folículos preovulatorios y su subsiguiente ovulación son inhibidos hasta que declina la progesterona en el momento de la regresión del cuerpo lúteo. En este sentido la sincronización del estro y ovulación realmente se significan el control del promedio de vida del cuerpo lúteo, en todas las especies el cuerpo lúteo solo responde a los agentes luteolíticos durante ciertas etapas de su desarrollo. La sincronización de ganado vacuno involucra el uso de prostaglandina solas o con tratamiento de progestágeno a corto plazo en combinación con estrógeno o prostaglandina.

2.2.1.1. La Prostaglandina

La prostaglandina $f2\alpha$ se ha aceptado generalmente como un agente luteolítico que termina con la corta vida del cuerpo lúteo cíclico de los mamíferos al final del diestro. La regresión del cuerpo lúteo resulta en una caída brusca de los niveles de progesterona en la sangre, que a su vez permite la liberación de las gonadotropinas de la hipófisis anterior causando que el animal regresa al estro o celo. Por lo tanto, la administración de prostaglandina $F2\alpha$ o sus análogos sintéticos, resultan en lutéolisis durante el diestro, lo cual es seguido por una secuencia normal de eventos endocrinos y fisiológicos que preceden el estro. Esta disminución de la fase lutéal es el mecanismo por el cual las prostaglandinas pueden ser utilizadas para controlar el celo (Syntex, 2005). Por otro lado Martines (2005), citado por Duica (2007), afirma que las prostaglandinas juegan un papel importante en la fisiología y el metabolismo de los mamíferos. El útero es la fuente más importante de la prostaglandina $f2\alpha$ en el ganado vacuno, la cual está asociada con la regresión del cuerpo luteo y con la recuperación del útero posparto. Después del celo, el útero secreta prostaglandina $f2\alpha$ para inducir la regresión del cuerpo luteo y así iniciar un nuevo ciclo estral si la vaca no se preña, en caso que la vaca resulte gestante la liberación de la prostaglandina $f2\alpha$ por el útero es inhibida y el cuerpo luteo se preserva para mantener la preñez. En este sentido Henao (2001), menciona que la prostaglandina tiene una función importante en la fertilidad tanto después del parto, para favorecer la involución uterina, como durante el ciclo estral, regulando la vida media del cuerpo lúteo. Los ácidos grasos son precursores de

la síntesis de prostaglandinas y las dietas ricas en grasas son una excelente fuente de estos precursores, sin embargo, las dietas altas en ácidos grasos poliinsaturados inhiben la síntesis de prostaglandinas y producen un cuerpo lúteo de mayor vida media.

2.2.2. Selección y Preparación de Receptoras

En el índice de preñez después de la transferencia de embriones influyen en forma notable el estado y la preparación de las hembras receptoras. Un animal que no es apto para un servicio natural no puede ser utilizado para la transferencia de embriones. Las hembras seleccionadas como receptoras deben ser buenas reproductoras tener una vía genital libre de infección y tres meses de haber pasado su último parto y no estar amamantando. Además las hembras receptoras deben de ser sexualmente maduras, con ciclos normales, estar en buenas condiciones y no tener sobrepeso (Hafez, 1989). Mientras que Stringfellow y Siedel (2000), nos comentan que el primer y quizás mas importante paso para transferir embriones es la selección de receptoras que sean saludables y reproductivamente sanas, son ideales los animales jóvenes, bien conformados, hembras lactantes en un equilibrio positivo de energía. Por lo menos debe de observarse un ciclo estral normal con anterioridad, estas hembras deben de ser de tamaño apropiado para parir con seguridad el feto, con un temperamento tranquilo y con un buen instinto materno y nivel de producción de leche. En este sentido Bo y col. (2002), mencionan que en la superioridad genética se debe de tener en cuenta factores como el ciclo estral

regular, precocidad reproductiva, dos o menos servicios por concepción en los años anteriores, comportamiento individual superior a la media del grupo en característica de importancia productiva (peso al destete, al año y a los dieciocho meses), que produzca crías superiores a la media del hato especialmente comparado con las hermanas de la hembra, hembras con ningún problema al parto, ninguna irregularidad reproductiva, así como ningún defecto genético de conformación detectable. Sin embargo, Gomes (2005), nos comenta que las hembras donantes deben de ser incluidas en un programa de nutrición balanceada antes de efectuar el proceso de superovulación, donde se debe procurar administrar forraje que brinde al animal los nutrientes necesarios para cumplan las funciones reproductivas, además de la incorporación de productos que proporcionen al animal adecuados niveles energéticos así como suplementos vitamínicos.

2.3. Búsqueda de Embriones

2.3.1. Maduración del Óvulo

La maduración de los ovocitos en mamíferos tiene dos etapas: a) un periodo de crecimiento, y b) un periodo de preparación nuclear y citoplásmica final requerida para la fertilización y desarrollo normal (Hafez, 1989).

2.3.2. Crecimiento del Ovocito

Cuando un folículo primordial sale de la reserva empieza a crecer junto con el ovocito. El crecimiento de este último termina casi en el momento en el momento

en el que se forma el antro. Mediante proyecciones celulares, las células internas del cúmulo colaboran en el crecimiento de del ovocito, pues establecen contacto íntimo con la membrana del éste. Se han descrito uniones estrechas, permeables y con pequeñas moléculas en vacas (Szollosi, 1975).

Durante la formación de la membrana externa del ovocito (zona pelucida), las prolongaciones de las células del cúmulo se refuerzan y mantienen las uniones de la membrana. La maduración de los ovocitos es inhibida cuando se añade un inhibidor de proteasa a los líquidos; pudiera utilizarse este inhibidor para conservar el potencial del inhibidor de maduración en el líquido folicular (Fleming y col., 1983).

2.3.3. Preparación del Ovocito para la Fertilización

El cultivo combinado de ovocito y células de la granulosa o tecales así como el cultivo del ovocito libre de células del folículo en un medio con extracto líquido folicular, ha demostrado que el mantenimiento del núcleo del ovocito en un estado reticular es resultado del efecto regresivo de la granulosa en el ganado vacuno (Foote y Thibault, 1969; Tsafirri y Channing, 1975). Por su parte Thibault (1977), señala que a partir de la ovogénesis, el núcleo en fase del diploteno del ovocito se mantiene en un estado de reposo denominado núcleo reticular. Por lo general, nunca se reinicia la meiosis antes de la producción ovulatoria de GnRH. Sin embargo, en todas las especies de mamíferos, cuando se extirpa el ovocito del folículo antral y se cultiva en un medio libre de gonodotropinas, reanuda la

meiosis en espontanea hasta la metafase I o la metafase II, etapas que se alcanzan normalmente en el momento de la ovulación.

En este sentido Hafez (1989), reporta que la función de secreción ovulatorio de Gonadotropina es suprimir la producción del factor inhibidor de la meiosis en células de la granulosa. Los cambios citológicos y ultra estructurales en las células de la granulosa después de la secreción súbita de la LH y FSH demuestran que esta secreción de gonadotropina es seguida por la modificación metabólica de esa capa folicular. La reanudación de la meiosis (maduración nuclear) es solo un aspecto de la maduración del huevo; también debe de ocurrir maduración del citoplasma. En vacas, ovejas o conejos, el desarrollo embrional nunca progresa normalmente cuando se trasfiere ovocitos extra foliculares que llegaron a segunda división meiótica *in vitro*.

2.4. Clasificación Morfológica de los Embriones

De Armas y Solano (1996), indican que por lo general no solo se transfieren los embriones normales que presentan un desarrollo de mórula o blastocitos, sino también es necesario tener en cuenta para la evaluación morfológica los siguientes aspectos:

- Esfericidad
- Estructuras visibles
- Estado de agregación de las células
- Variación de talla entre las células

- Células desprendidas en el espacio perivitelino
- Integridad de la zona pelúcida

De acuerdo a su aspecto morfológico los embriones son categorizados en diferentes grados o escalas de calidad:

Grado 1 (Excelentes)

Embriones considerados como normales por su respectivo estado de desarrollo. Muestran contornos celulares bien definidos y no hay dispersión ni destrucción en los blastómeros.

Grado 2 (Buenos)

Embriones con algunos cambios tales como: Granulaciones atípicas, algunas células con signos de degeneración y opacidades anormales.

Grado 3 (Pobre calidad o regulares)

Embriones que presentan blastómeros dispersos (poca cohesión) y mayor grado de degeneración, ocasionalmente blastómeros asimétricos, pero parte de la masa celular se mantiene viable.

Grado 4 (Malos)

Alto grado de degeneración que imposibilita determinar el grado de desarrollo.

En este sentido Linder y Wright (1983); citado por De León y Roderick (2009) señalan que para evaluar la calidad de los embriones se toma en cuenta su eclosión, la formación y la expansión del mismo, bajo este criterio estos autores clasifican los embriones en:

Los transferibles:

- **Excelente:** Embrión simétrico con diferenciación notoria del macizo celular interno (MCI) y del blastocele.
- **Bueno:** Embrión simétrico con diferenciación del MCI y el blastocele.
- **Regular:** Embrión simétrico o levemente asimétrico con diferenciación del MCI y del blastocele.
- **Malo:** Embrión asimétrico sin diferencia del MCI y del blastocele.

Los no transferibles: Retrasados, Degenerados

2.4.1. Transferencia de Embriones

Estudios realizados por De Armas (1997) y Fernández (2005), señalan que la transferencia de embriones es una técnica que consiste en recolectar embriones mediante el lavado del útero de una hembra donadora para su posterior colocación en el útero de otra hembra receptora, donde se desarrollará la gestación. Este mismo autor indica que este trabajo se inicia con la superovulación de la donadora, a la cual se le administra hormona FSH dos

veces por día mañana y tarde durante cuatro días, dos o tres días después de iniciado el tratamiento con FSH se aplica una prostaglandina F2 α sintética o sus análogos con el objeto de inducir el celo el cual será complementado con una o dos inseminaciones con un intervalo de 12 horas.

La superovulación se inicia ocho a 10 días después del último celo en presencia de un cuerpo lúteo o el quinto día después de haber colocado un dispositivo intravaginal o subcutáneo conteniendo progesterona. Alrededor de seis a siete días después de la inseminación artificial de la donadora, se realiza el lavado del tracto reproductivo; en ese momento, ya los huevos han alcanzado el útero después de su fertilización a nivel de trompas. Previo al lavado los animales son inmovilizados, lo que es complementado con la aplicación de anestesia epidural utilizando cinco milímetros de lidocaína al dos por ciento. Mediante manipulación a través del recto se introduce en el interior del útero una sonda de Foley N $^{\circ}$ 16 ó 18 de dos vías que posee un balón de cinco a 30 milímetros. Luego los cuernos uterinos son lavados de manera intermitente con 30 a 60 milímetros de una solución salina enriquecida estéril, la cual es introducida y drenada por gravedad o mediante presión y succión simultánea utilizando una jeringa desechable de 50 milímetros. Durante la recolección, la solución drenada atraviesa un filtro especial para separar los embriones. Al final del lavado, una pequeña porción del líquido concentrado y retenido en el filtro, es vertida en placas de petri desechables 100 milímetro x 20 milímetro.

Para la búsqueda de los embriones se emplea una lupa estereoscópica (40X), los embriones seleccionados e identificados son transferidos a otras placas de petri redondas 40 milímetro x 10 milímetro conteniendo medio de mantenimiento. Los embriones considerados de buena calidad (transferibles) son montados en pajuelas de plástico estériles de 0,25 milímetros (mini pajuelas) para su posterior transferencia o almacenamiento en nitrógeno líquido. Los embriones son transferidos por vía vaginal en el cuerno uterino ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo previamente detectado por palpación rectal en receptoras que seis a ocho días antes habían presentado celo natural o fueron sincronizadas.

La pistola para el trasplante es muy parecida a la utilizada en la inseminación artificial con la diferencia de ser algo más larga y fina, siendo la funda externa en su extremo anterior, metálica o de plástico resistente. Después de traspasar el cérvix, el extremo de la pistoleta es dirigido cuidadosamente hacia el interior del cuerno del mismo lado en el cual se encuentra el cuerpo lúteo de la ovulación depositando el embrión en el segundo o último tercio de su longitud.

2.4.2. Desarrollo Post-trasplante del Embrión

Thatcher (1994), reporta que después de ser trasplantado o transferido el embrión este va a encontrar un desarrollo uterino que favorece su desarrollo, es entonces cuando el embrión eclosiona de su zona pelúcida, la cual es una barrera externa que protege el embrión del medio en que se encuentra, alcanzando la etapa de blastocito eclosionado. En esta etapa comienza a tener contacto directo con el

medio uterino, el cual es un periodo crítico ya que del día ocho al 17 ocurre aproximadamente un 30 a 40 por ciento de las pérdidas embrionarias. En este sentido Rodríguez (2001), menciona que el establecimiento satisfactorio del embrión es producto de la interacción entre este con su membrana asociada y el endometrio de la hembra receptora, logrado mediante el proceso denominado reconocimiento materno de la preñez. En la técnica de transplante de embriones debe tenerse en cuenta que el embrión es 100 por ciento ajeno a la hembra receptora, motivo por el cual es más sensible la activación de los mecanismos luteolíticos. Por su parte Oliphant y col. (1984), reportan que el ambiente del útero es hostil para el embrión que se encuentra en las primeras etapas de su desarrollo, únicamente se encuentra rodeado por un fluido uterino y viductal que contiene compuestos derivados del suero sanguíneo aportando electrolitos, sustratos energéticos y productos específicos que hacen que aumente la posibilidad de supervivencia del embrión durante esta etapa. Burges (1990) y Hernández (1995), indican que al producirse la salida del embrión de la zona pelúcida, proceso conocido como eclosión, el blastocito presenta un área celular interna llamada embrioblasto y una capa externa denominada trofoblasto el cual es el precursor para la formación de la placenta, durante este periodo continúa el desarrollo embrionario y el cuerpo lúteo sigue secretando progesterona; al llegar el embrión al día 14 a 18. Spencer y col. (2004), señalan que las células del trofoblasto inician la secreción de una proteína trofoblástica bovina, también denominada interferón Tau, la cual se presenta antes de iniciar el mecanismo luteolítico en la hembra.

Esta es la señal que envía el embrión para que se bloquee la transcripción del gen que codifica para los receptores de oxitocina y de la misma forma hace que se expresen los mecanismos inhibidores para la síntesis de prostaglandina F_{2α}, haciendo que se mantenga el cuerpo lúteo y de la misma manera continúe la secreción de progesterona, la cual es la encargada del establecimiento y mantenimiento de la preñez en mamíferos.

2.4.3. Eficiencia Reproductiva de la Técnica de Trasplante de Embriones

Simplemente se busca multiplicar de forma masiva, aquellas vacas que muestren condiciones excepcionales con relación a la producción de leche o de carne. En vez de obtener una cría al año, se obtendrán de 18 a 32 con la ventaja de poder seleccionar aquellos embriones que producirán hembras y los machos eliminarlos en caso que no se deseen. Una vaca no debe someterse a más de tres tratamientos de superovulación al año. Lo primero que se debe lograr en la aplicación de esta técnica, es la proliferación de óvulos en la vaca que se quiere multiplicar (Castellanos, 2007). En esta sentido Tribulo (2002), citado por Duica (2007), señala que la técnica de trasplante de embriones presenta ventajas y desventajas como en cualquier otro procedimiento biotecnológico.

Las ventajas de esta biotecnología son básicamente la obtención de una descendencia genética superior, la disminución de riesgos de contagio de enfermedades infecciosas, el mejoramiento genético de un grupo de animales a corto plazo, la multiplicación de las características de una hembra

genéticamente superior, rescate genético de animales accidentados o enfermos permanentemente de los que se pudieran obtener embriones antes de que el animal muera, permite hacer una planificación de los cruzamientos y permite la producción de gemelos por micro manipulación. Sin embargo, Baruselli (2005), citado por Duica (2007), indica que las desventajas que deben ser evaluadas antes de la aplicación de esta técnica son la variabilidad que se presenta en materia de resultado la poca disponibilidad de hembras receptoras ideales.

2.4. La inseminación Artificial

La inseminación artificial en el ganado bovino se define como una técnica para la reproducción que consiste en colocar semen procesado procedente de un toro sano, en el cervix de una vaca sana en celo. Durante la monta natural un toro eyacula en la vagina de la vaca; así se puede obtener una preñez y posiblemente un becerro. Si ese eyaculado es recolectado procesado y congelado adecuadamente se pueden obtener entre 140 y 210 dosis de inseminación, con las que pueden preñarse unas 100 vacas y obtener unos 90 becerros con ese solo eyaculado. Usando mejores toros, obtendremos muchos hijos de superior calidad genética, lo que se expresa en más kilos de carne, más litros de leche, mejor conformación fenotípica, mejor conversión de alimentos y en general mejores características productivas, siempre y cuando se garanticen adecuadas condiciones sanitarias y alimenticias para que se pueda expresar el potencial genético del animal (Roa 2005). Si embargo, Cole y Cupps (1972) mencionan que la inseminación es una técnica que puede producir una mayo

fertilidad en las vacas depositándose el semen en la parte anterior del cervix o en el cuerpo uterino en la primera inseminación. Las inseminaciones sucesivas deben de depositarse únicamente en la parte anterior del cervix, para evitar la interrupción de posibles gestaciones en curso. Estos mismos autores señalan que las inseminaciones vaginales con ayuda de especulum dan peores resultado en el ganado vacuno. Estudios recientes de Pickett y col. (1974), demuestran que la palpación excesiva del aparato reproductor antes de la inseminación puede ir en detrimento de la fertilidad de las yeguas. Por otra parte, el estímulo del aparato reproductor, incluido el masaje del clítoris tras la inseminación, puede mejorar los índices de concepción en el bovino.

2.5.1. Ventajas de la Inseminación Artificial

En cuanto a las ventajas de la inseminación artificial Roa (2005), describe las ventajas de esta técnica:

Mejoramiento Genético: Al emplearse semen de toros probados cuya calidad genética ha sido comprobada por medio de pruebas de progenie o descendencia, se espera un mejoramiento del tipo y una mayor producción de leche y carne. Los toros utilizados en monta natural dejan unas 300 crías durante su vida reproductiva, pero si se usa en inseminación artificial, su descendencia puede llegar a ser cientos de veces mayor.

Prevención de enfermedades genitales: Al evitar el contacto directo entre la hembra y el macho se previene el contagio e introducción de enfermedades tales como la tricomoniasis genital, campilobacteriosis, leptospirosis y otras.

Innecesaria Importación de toros : Al traer reproductores se corren algunos riesgos, entre ellos el peligro de aclimatación e introducción de enfermedades y los costos del mantenimiento de estos toros en la finca; en cambio la importación o compra de semen nacional es más barato y fácil de realizar.

Mayor Control Reproductivo: La utilización de inseminación artificial conlleva el examen genital periódico de los animales y el tratamiento o eliminación de aquellos que presentan infecciones uterinas. También se hacen correcciones de deficiencias nutricionales especialmente en el campo del fósforo y otros minerales. Los toros se controlan, mediante el análisis continuo del semen.

Mayor Número de Sementales Disponibles: En monta natural, generalmente se tiene un toro para 25 a 30 vacas. Por la inseminación artificial se puede mantener en el termo de nitrógeno líquido una cantidad considerable de semen de varios toros, de acuerdo con el tipo de vacas y con el propósito que se fije.

Mayor Rendimiento Económico: Al emplear semen de toros probados, estos transmiten su elevada capacidad de producción lechera, cárnica o de doble propósito y buenas características fenotípicas, lo cual redundará en un mayor

beneficio económico. Además los costos de capital, el sostenimiento y riesgos que implica el cuidado de los toros, desaparecen con la Inseminación Artificial.

2.6. Inducción de Doble Gestación

2.6.1. Por Transferencia en Vacas Pre-inseminadas

Los partos dobles en el bovino son una característica que posee una baja heredabilidad (0,03) y repetibilidad (0,06). Las estimaciones de la frecuencia de nacimientos dobles varían entre un uno y cinco por ciento dependiendo, principalmente de la raza, edad y condiciones ambientales (Morris, 1984). La incidencia de gemelos de origen natural varía con la raza y puede reflejar las diferencias no sólo en la tasa de ovulación, sino la alta capacidad para mantener un preñes gemelar (Rutledge, 1975).

Sin embargo, ha sido demostrado que es posible obtener una alta incidencia de gestaciones dobles al transferir dos embriones bilateralmente al útero de hembras receptoras (Rowson y col., 1971).

Investigaciones realizadas por Gordon y col. (1962) y Gordon (1989) indican que una de las aplicaciones de la transferencia de embriones debería ser la introducción de un segundo embrión al útero de vacas días después de la cubierta. En este sentido Penny y col. (1995), reportan que actualmente la mayoría de las inducciones de mellizos en bovinos, mediante la transferencia de

un segundo embrión al útero de hembras previamente cubiertas, tanto en programas comerciales como en centros de investigación, se realizan depositando el embrión en el cuerno uterino contralateral al cuerpo lúteo.

Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la transferencia embrionaria al cuerno ipsilateral podría presentar ventajas comparativas al método contralateral, para lograr preñeces dobles en este tipo de receptoras.

El principal objetivo al transferir el embrión en el cuerno uterino contralateral al cuerpo lúteo es evitar la coexistencia de dos embriones en un mismo cuerno, ya que ha sido reportado que ovulaciones dobles unilaterales coinciden con altas tasas de mortalidad embrionaria en comparación con ovulaciones dobles bilaterales u ovulaciones únicas (Rowson y col., 1971 y Hanarahan, 1983).

Por otra parte, de establecerse la gestación doble unicornual, las posibilidades de aborto serían mayores que si ésta fuera bilateral (Reichenbach y col., 1992). Sin embargo, existen estudios realizados por Sreenan y Diskin (1986), que demuestran que no habría diferencia en el porcentaje de abortos presentados por vacas gestando mellizos unilateral o bilateralmente.

La transferencia de un segundo embrión contralateral al cuerpo lúteo tiene como desventaja que la sobrevivencia de éste es altamente dependiente de la sobrevivencia del embrión nativo que se encuentra en el cuerno ipsilateral al cuerpo

lúteo (Gordon, 1989; Sinclair y col., 1995). Siendo altamente improbable que el embrión transferido se desarrolle al menos que el embrión nativo haya podido sobrevivir más allá del día 20 post ovulación (Penny y col., 1995). Por otro lado, se ha encontrado que aproximadamente un 18 por ciento de las receptoras previamente inseminadas no tendrán su embrión nativo viable en el cuerno uterino ipsilateral al día siete post estro, debido principalmente a fallas en la fecundación y mortalidad embrionaria temprana (Sreenan y Diskin, 1986).

Más aún se señala que para el día 20 post cubierta la mayor parte de la mortalidad embrionaria ya ha ocurrido y ésta llega a afectar al 30 por ciento de los embriones (Silvia, 1994).

Otros trabajos señalan que la mayor frecuencia de pérdidas feto/embrionarias en gestaciones dobles ocurre entre los 35 y 60 días de gestación periodo que coincide con el desarrollo placentario y la implantación. De esta manera, es poco probable que la transferencia contralateral de un segundo embrión a una hembra bovina previamente cubierta aumente la tasa de preñez alcanzada solamente con la inseminación artificial (Izaike y col., 1991; Echterkamp, 1992; Silva y col., 2000; López-Gatius y Hunter, 2004; citados por Caballero, 2005).

En este sentido Penny y col (1995), indica que la técnica de transferencia ipsilateral aumentaría las probabilidades de que sobreviva del embrión

transferido ya que si el embrión nativo no sobrevive, el transferido se encontrará en una ubicación muy adecuada con respecto al cuerpo lúteo.

Estudios sobre mellizos, han informado que los períodos de gestación son más corto y con menor peso al nacer en lugar partos individuales, la duración de gestación de gemelos nacidos en el ganado bovino es de aproximadamente cinco a siete días más cortos en comparación con gestaciones de nacimientos individuales Echterkam y Gregory (1999). En este sentido el mellizaje bovino presenta un nuevo paradigma en la gestión de ganado vacuno y la producción, ofrece una oportunidad de aumentar reproductivamente la producción animal y así mejorar la eficiencia económica de una finca. Sin embargo, parte de la ganancia económica y el potencial de mellizos en el ganado se ve comprometida por la disminución de la supervivencia de terneros Gregory y col. (1996), por aumento de la incidencia de distocia Cady y Van Vleck (1978); Gregory y col. (1990; 1996) y la placenta retenida Turman y col. (1971); Fuelle y col. (1974); Anderson y col. (1982).

El ganado vacuno (***Bos taurus***) son una especie uníparos el sentido de que en la mayoría de los casos las hembras producen solo una descendencia por preñes (Rutledge, 1975). Si embargo, Silva y col. (2000) encontraron que es posible obtener una tasa de preñez y una tasa de inducción de gestaciones de mellizos aceptable (Cuadro I), utilizando un procedimiento de transferencia de un segundo embrión congelado-descongelado depositado en forma ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo 7 días post cubierta en vacas.

CUADRO I. TASA DE PREÑEZ Y DE GESTACIONES DOBLES, A LOS 60 Y 90 DÍAS POST-CUBIERTA E INOVULACIÓN DE UN SEGUNDO EMBRIÓN CONGELADO-DESCONGELADO DEPOSITADO IPSILATERAL O CONTRALATERALMENTE AL CUERPO LÚTEO A LOS 7 DÍAS POST CUBIERTA EN VACAS.

	IPSILATERAL	CONTRALATERAL	TOTAL
Número Receptoras	32	28	60
Tasa de preñez 60 días (%)	21 / 32 (65,6%)	21 / 28 (75%)	42 / 60 (70%)
Tasa de Preñez Doble 60 días (%)	12 / 21 (57,1%)	3 / 21 (14,3%)	15 / 42 (35,7%)
Tasa de preñez 90 días (%)	20 / 32 (62,5%)	21 / 28 (75%)	41 / 60 (68,3%)
Tasa de Preñez Doble 90 días (%)	9 / 20 (45%)	1 / 21 (4,8%)	10 / 41 (24,4%)

Fuente: Silva (2000)

Esto indica que Silva y col. (2000), encontraron que en el grupo de transferencias ipsilaterales 21 receptoras se preñaron al primer servicio 65,6 por ciento, mientras que en el grupo contralateral 21 de las 28 receptoras se diagnosticaron preñadas 75 por ciento, no existiendo diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, sí se observó diferencias en la tasa de preñez doble, entre los 60 y 90 días post servicio en ambos grupos 57,1 v/s 14,3 por ciento y 45 v/s 4,8 por ciento respectivamente.

Una baja tasa de reproducción es uno de los principales factores que limitan la productividad en el sector del ganado de carne. Más del 50 por ciento del total de los costos de producción se atribuyen al mantenimiento de reproducción de las hembras un valor comparable a base de carne de pollos es de

aproximadamente tres por ciento (Dickerson, 1978). Sin embargo, Guerra y col. (1990), señalan que incluso teniendo en cuenta mayor mano de obra y costos veterinarios, el aumento en la eficiencia de la producción de ganado de carne por el mellizaje puede llegar a 24 por ciento. Además, la obtención de freemartins infértiles carece de importancia en el sector del ganado de carne, debido a que la mayoría de los terneros son destinados al sacrificio.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación y Caracterización del Área Experimental

El estudio fue realizado dentro del Proyecto de Mejoramiento Genético y Biotecnología Animal de la Estación Experimental “*Carlos Manuel Ortega*” del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) durante los meses de mayo a noviembre del 2009. La misma se encuentra en el distrito de Gualaca, provincia de Chiriquí, a 100 metros sobre el nivel del mar, con una precipitación anual de 4200 milímetros y temperatura media anual de 26,3 grados centígrados. El suelo es franco arcilloso, latosólico; color rojo de origen mixto basáltico y andesítico. Posee buena estructura y drenaje; pH de 5,0 a 5,2; materia orgánica de cinco por ciento; fósforo (P) de dos partes por millón y potasio (K) de 36 a 40 partes por millón.

3.2. Animales Experimentales y Manejo

Se utilizaron vacas Brahmán multíparas con una condición corporal de cuatro a cinco (escala de 1 a 9), buen estado de salud y un excelente desarrollo de su estructura reproductiva. Estos animales fueron sometidos a una selección al asar y se alojaron en un área con pasto *Brachiaria humidicola* fertilizado con una dosis anual de 60, 30 y 20 kilogramos por hectáreas de N, P₂O₅ y K₂O, manejado adecuadamente en rotación de siete días de pastoreo y 21 días de

descanso. Se trabajó con 20 animales, los cuales se dividieron en tres grupos. En el primer grupo se trabajaron cinco animales, en el segundo siete y en el tercer grupo ocho animales. Se sincronizó el primer grupo de animales tomando en cuenta que el animal presentara un cuerpo lúteo funcional, utilizando 250 miligramos de Cropostenol[®] y se detectó la presencia de celo a partir de la 48 horas post aplicación. Todos los animales fueron inseminados en presencia de celo con semen de toro de la raza Wagyu y el mismo día que los animales se inseminaron se realizó la fertilización *in vitro* (FIV) de los embriones. Para esta técnica se utilizó el procedimiento de Denis (2007), manual de OPU, el cual consiste en la selección de ovarios de animales de matadero con presencia de folículos, con el propósito de aspirar el líquido folicular con una jeringuilla y así encontrar los ovocitos, luego el líquido contenido en las jeringuillas es vertido en tubos o directamente en placas petri de 100 milímetros para la búsqueda de los células del cúmulo, aquellos ovocitos aptos (categoría I y II) para la maduración *in vitro* (MIV) fueron lavados varias veces en placas petri (35 milímetro) con medio de lavado. Luego estos ovocitos son madurados *in vitro*, al segundo día de ser seleccionado los ovocitos se fertiliza con semen que a pasado por un proceso de capacitación espermática, luego al tercer día se prepara el medio de cultivo *in vitro*, al quinto día se reemplaza el 100 por ciento del medio de cultivo con medio fresco y se valora el porcentaje de división embrionaria hasta ese momento, finalmente al séptimo día se observan los diferentes estadios embrionarios. Estos ovocitos se fertilizaron con semen de toros de las razas Angus Rojo, Beefmaster y Charolais.

3.3 Tratamientos

Los tratamientos consistieron en la transferencia de un segundo embrión producto de fertilización *in vitro* en estado de blastocisto, de manera ipsilateral (T₁) y contralateral (T₂), al cuerpo lúteo; siete días después de haber sido inseminadas las hembras, fueron seleccionadas las hembras multíparas al azar.

3.4 Variables de Respuesta y Periodo de Evaluación

Treinta días después de haber inseminado los animales se procedió a realizar los diagnósticos de concepción de cada en cada una de las recetoras, a través de ultrasonografía transrectal. Para ello se utilizó un ecógrafo Sonovet 2000, con un transductor lineal de 7.5 megahertz. Para confirmar el desarrollo de la gestación se continuo el monitoreo de las mismas los 60 y 90 días post inseminación.

Las variables evaluadas fueron:

Porcentaje de concepción (evaluadas a los 30 días)

Porcentaje de gestación (evaluadas a los 60 días)

Porcentaje de gestación simple y doble (evaluadas a los 90 días)

3.5. Diseño Experimental y Modelo Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando la prueba de Chi² (χ^2) por medio del **PROC CATMOD** y **PROC FREQ** de **SAS**[®], el cual es un modelo no paramétrico.

La ecuación matemática utilizada fue la siguiente:

$$Y_{ijk} = T_i + P_j + T_i * P_j + e_{ijk}$$

Donde,

Y_{ijk} = Variables de respuesta

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

P_j = Efecto del j-ésimo periodo

$T_i * P_j$ = Efecto de interacción entre tratamiento por periodo

e_{ijk} = Error experimental

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Porcentaje de Concepción (Evaluadas a los 30 días)

Se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$) (cuadro II), resultando el T2 con el mayor porcentaje de preñez con 50 por ciento (Cuadro III).

CUADRO 2. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA MÁXIMA PROBABILIDAD DE CHI CUADRADO.

Fuente de variacion	Grados de libertad	Chi cuadrado	Probabilidad Chi cuadrado
Trt	1	4.41	0.0358*
Per	2	2.34	0.3101 ^{ns}
Trt *Per	2	0.70	0.7037 ^{ns}
Radio de probabilidad	1	4.44	0.0351*

*diferencia significativa $p < 0.05$

Sin embargo, no se encontró diferencia significativa para el efecto de los periodos ni la interacción tratamiento por periodo ($p > 0.05$) (cuadro II). Estos resultados coinciden con lo encontrado por Silva y col. (2000), quien demostró que es posible obtener una tasa de preñez y una tasa de inducción de gestaciones de mellizos aceptable (cuadro I), utilizando un procedimiento de

transferencia de un segundo embrión congelado-descongelado depositado en forma ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo siete días post cubierta en vacas.

Este mismo autor señala que aun cuando la tasa de inducción de mellizos fue elevada, la tasa de partos de mellizos fue muy inferior al diagnóstico ecográfico temprano obteniendo de 15/42 gestaciones dobles a los 60 días vs 10/41 partos de mellizos.

En este sentido Sakaguchi y col. (2002), encontraron una tasa de gestación de 68 por ciento al día 80 pos-transferencia después de dos embriones FIV en vacas de raza japonesa.

Sin embargo, Gordon (1989); Sinclair y col. (1995), señalan que la transferencia de un segundo embrión contralateral al cuerpo lúteo, tiene como desventaja que la sobrevivencia de éste es altamente dependiente de la sobrevivencia del embrión nativo, que se encuentra en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo. Siendo altamente improbable que el embrión transferido se desarrolle a menos que el embrión nativo haya podido sobrevivir más allá del día 20 post ovulación (Penny y col., 1995).

Reichenbach y col. (1992), indican que de establecerse la gestación doble unicornual, las posibilidades de aborto serían mayores que si ésta fuera bilateral. Más sin embargo, Sreenan y Diskin (1986), mencionan que no habría diferencia en el porcentaje de abortos presentados por vacas gestando mellizos unilateral o bilateralmente.

Por otro lado, Rowson y col. (1971), señalan que ha sido demostrado que es posible obtener una alta incidencia de gestaciones dobles al transferir dos embriones bilateralmente al útero de hembras receptoras. Pero que es poco probable que la transferencia contralateral de un segundo embrión a una hembra bovina previamente cubierta, aumente la tasa de preñez alcanzada solamente con la inseminación artificial.

De acuerdo con lo señalado anteriormente, algunos autores concluyen, que el principal objetivo al transferir el embrión en el cuerno uterino contralateral al cuerpo lúteo es evitar la coexistencia de dos embriones en un mismo cuerno, ya que ha sido reportado que ovulaciones dobles unilaterales coinciden con altas tasas de mortalidad embrionaria en comparación con ovulaciones dobles bilaterales u ovulaciones únicas (Rowson y col., 1971 y Hanarahan, 1983).

En este sentido estos mismos autores reportan que son varios los informes que demuestran que la ubicación unilateral de dos embriones aumenta la ocurrencia de muerte embrionaria y disminuye la posibilidad de presentación de mellizos.

CUADRO III. TASA DE CONCEPCIÓN A LOS 30 DÍAS IPSILATERAL O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO.

	IPSILATERAL	CONTRALATERAL	TOTAL
Número de animales	10	10	20
Tasa de concepción a los 30 días (%)	3/10 (30%)	7/10 (70%)	10/20 (50%)

Catena (2007), nos dice que cuando se habla de preñez se establece una relación **conceptus**-madre, influenciada por factores del medio ambiente, existiendo una relación directa entre el embrión y la madre en la etapa embrionaria. En este sentido se reconoce un estado de privilegio en la protección de la unión **conceptus**-maternal por el sistema inmune local y sistémico de la madre durante implantación, placentación y gestación. Afirma que en este estado armonioso durante la faz embrionaria se permite la viabilidad del **conceptus**, dependiendo de una serie de factores anatómo-fisiológicos, hormonales, inmunológicos, genéticos, entre otros que permiten mantener la compleja interacción. Dicha interacción puede verse alterada ante la presencia de diferentes agentes y la incapacidad del aparato reproductor de restaurar el equilibrio.

Este mismo autor señala que es conocida la existencia durante la preñez de inmunodepresión e inmunosupresión inespecífica (linfocitos T y B) que hacen a la vaca preñada más vulnerable a los agentes infecciosos. Los linfocitos T son los más afectados durante la gestación con un incremento importante de los linfocitos T supresores, que controlan a los linfocitos T helper, por lo tanto disminuye la respuesta a los antígenos que dependen de ellos como los virus y las bacterias asociados a células.

Esta inmunosupresión es generada por la alta concentración de progesterona normal en la etapa de gestación y agravada en el período peripartal por la alta

concentración de corticoides. Por lo tanto durante la gestación y el parto se producen cambios hormonales y por consiguiente inmunes, que favorecen la presentación de agentes infecciosos.

Por su parte González (2008), indica que alrededor del 90 por ciento de los ovocitos son fertilizados después de la monta o inseminación; sin embargo, una alta proporción de estas gestaciones se pierden. En este sentido, Hernández (1994), señala que la muerte de embriones antes del reconocimiento materno de la gestación días 16 a 19 es considerada como muerte embrionaria temprana. La que ocurre entre el reconocimiento materno de la gestación y el momento en que se ha completado la organogénesis alrededor del día 42 se denomina muerte embrionaria tardía y la pérdida de la gestación posterior al día 42 se llama muerte fetal. La muerte embrionaria temprana expresa pérdidas de gestaciones de 40 a 60 por ciento, la tardía de 10 a 15 por ciento y la muerte fetal con 5 a 15 por ciento.

Las causas de la muerte embrionaria son diversas y están relacionadas con la alta producción láctea, intervalo de parto a la primera ovulación, balance energético negativo, problemas del puerperio, momento de la inseminación, técnica de inseminación, características de la dieta, estrés calórico, infecciones uterinas y factores genéticos.

En este sentido Jonker y col. (2004), señalan que enfermedades maternas generan un riesgo potencial de muerte fetal por la liberación de productos inflamatorios a la circulación general tales como prostaglandinas.

Otros trabajos señalan que la mayor frecuencia de pérdidas feto/embrionarias en gestaciones dobles ocurre entre los 35 y 60 días de gestación (Izaike y col., (1991); Echterkamp (1992); Silva y col. (2000); López-Gatius y Hunter (2004); citados por Caballero (2005), periodo que coincide con el desarrollo placentario y la implantación. Por su parte, Echterkamp (1992); López-Gatius y Hunter (2005); citado por Caballero (2005); afirman que la muerte embrionaria doble es debido a que el útero tiene una capacidad máxima para un número de fetos. Esta capacidad varía entre hembras y especies. Si el número de fetos excede ese límite de capacidad uterina, hay un mecanismo inherente para terminar la gestación. La hembra bovina no es capaz de seleccionar el feto muerto y reabsorberlo en forma individual cuando existe anastomosis de la placenta como sucede en el 90 por ciento de los casos.

Es probable que la pérdida embrionaria y gestaciones de mellizos observada en el presente estudio sea consecuencia del menor potencial de desarrollo observado en embriones FIV, con relación a obtenidos en forma natural lo cual se reflejo en la disminución del porcentaje de gestaciones totales y gestaciones dobles en los diferentes periodos de evaluación.

4.2. Porcentaje de Gestación (Evaluadas a los 60 días)

Al analizar el presente trabajo el número de gestaciones dobles (cuadro IV), con respecto a las hembras totales tratadas, se observó que a los 60 días post servicio el 40 por ciento de las receptoras en el grupo de transferencias contralateral (T_2), gestaba mellizos, en comparación al 20 por ciento del grupo de transferencias Ipsilateral (T_1).

CUADRO IV. TASA DE GESTACIÓN A LOS 60 DÍAS IPSILATERAL O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO.

	IPSILATERAL	CONTRALATERAL	TOTAL
Tasa de gestación a los 60 días (%)	2/10 (20%)	4/10 (40%)	6/20 (30%)
Tasa de gestación doble a los 60 (%)	2/10 (20%)	4/10 (40%)	6/20 (30%)

Estos resultados son contradictorios a lo señalado por Sreenan y Diskin (1989) y Wilkins (1992), los cuales indican que al realizar transferencias dobles unilaterales, el confinamiento de dos embriones dentro del cuerno uterino ipsilateral no aumenta la tasa de mortalidad embrionaria ni fetal, al compararse con la distribución bilateral.

Sin embargo, Silva y col. (2000), encontraron un 70 por ciento de gestaciones totales a los 60 días con vacas transferidas ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo. Este 70 por ciento se distribuyó en 65.6 por ciento ipsilateral y 75 por ciento contralateral. De igual manera, Sreenan y Diskin (1989) y Rowson y col.

(1971), indican que los porcentajes de preñez alcanzados con transferencias trans cervical, ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo en vacas previamente inseminadas fueron de 76 y 75 por ciento y 73 y 72 por ciento respectivamente a los 50 días.

4.3. Porcentaje de Gestaciones Simple y Dobles (Evaluadas a los 90 días)

En cuanto al porcentaje de gestaciones dobles alcanzadas, estas representaron un 83.3 por ciento del total de gestaciones obtenidas (cuadro V). De éste 83.3 por ciento el 50 por ciento de gestaciones dobles se obtuvieron en el T2 (contralateral) y el 33.3 por ciento en el T1 (ipsilateral).

CUADRO V. TASA DE GESTACIÓN SIMPLE Y DOBLE A LOS 90 DÍAS IPSILATERAL O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO.

	IPSILATERAL	CONTRALATERAL	TOTAL
Tasa de gestación a los 90 días (%)	2/10 (20%)	4/10 (40%)	6/20 (30%)
Tasa de gestación simple (%)	0	1/10 (10%)	1/20 (5%)
Tasa de doble gestación 90 días (%)	2/10 (20%)	3/10 (30%)	5/20 (25%)
Porcentaje de doble gestación totales	100%	75%	83.3%*

*El 83.3% representa el total de todas las gestaciones obtenidas

Estos resultados son contradictorios con lo señalado por Penny y col., (1995), los cual señalan que el mayor porcentaje de gestaciones dobles en vacas previamente inseminadas se alcanzan cuando la transferencia se realiza de manera ipsilateral. Sin embargo Silva y col. (2000), encontraron una tasa de 65,6 por ciento de preñez lograda en el grupo de transferencia ipsilateral y de 75 por ciento en el grupo contralateral al cuerpo luteo a los 90 días (cuadro I). Estos resultados son diferentes a los valores encontrados en el (cuadro V), el cual indica que al comparar el número de gestaciones dobles a los 90 días post cubierta, obtenidos en cada grupo de transferencia, se observa que el 30 por ciento obtenido en el grupo contralateral se acercan a los valores de 42 por ciento encontrados por Reichembach y col. (1992), de 54.2 por ciento por Izaike y col. (1988). Sin embargo, Sinclair y col. (1995) y Wilkins y col. (1992) reportan un 70 y 61 por ciento respectivamente. A su vez el valor de 20 por ciento para este parámetro, obtenido en el grupo de transferencias ipsilaterales (T1), es muy inferior a valores reportado por Reichembach y col. (1992) de 33 por ciento, Sinclair y col. (1995) de 49 por ciento y Wilkins y col. (1992) 66 por ciento. Se debe considerar que todos los trabajos mencionados previamente se basaron en transferencia de embriones frescos, los que poseen una mayor viabilidad post transferencia que los embriones que han sufrido procesos de congelación y descongelación o los obtenidos de ovocitos de vacas de matadero (Tervit y col., 1981; Leibo, 1986; Sreenan y Diskin, 1987) como lo es en este trabajo.

V. CONCLUSIÓN

Según los resultados encontrados se concluye que la transferencia de un segundo embrión al cuerno uterino contralateral al cuerpo lúteo en vacas previamente inseminadas es el método más efectivo de inducción de gestaciones dobles. Por consiguiente, la transferencia de un segundo embrión en forma contralateral al cuerpo lúteo debería utilizarse siete días después de cada inseminación realizada en el rebaño para lograr así altos porcentajes de gestaciones dobles.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar el tamaño del cuerpo lúteo en los animales que se seleccionen para estos trabajos, que sea un cuerpo lúteo con un tamaño de 12 a 13 milímetros para así asegurar una buena liberación de progesterona y así poder mantener una doble gestación.
- Al momento de la selección de los animales, se debe de evaluar su condición corporal, condición cinco en (escala de 1 a 9) para así asegurar una buena aceptación del embrión transferido y así evitar un balance energético negativo.

VII. REFERENCIAS CITADAS

Anderson, G.B.; R.H BonDurant y P.T. Cupps. 1982. Induction of twins in different breeds of cattle. *J. Anim. Sci.* 54:485-490.

Ayalon, N. 1978. A review of embryonic mortality in cattle. *J.Reprod. Fertil.* 54:483-493.

Ascoli, M.; Segaloff, D.L. 1996. Hormonas adenohipofisarias y sus factores liberadores hipotalámicos sección xiii. cap.55 pp 1447-1467 en: goodman & gilman las bases farmacológicas de la terapéutica volumen 1. 9a. Ed. Panamericana

Bo, G.; Barsuelli, P.; Moreno, D.; Cuaita, L.; Caccia, M.; Tribulo, R.; Mapletoft, R. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle

Bellows, R.A.; R.E. Short.; J.J. Urick y O.F. Pahnish. 1974. Effects of early weaning on postpartum reproduction of the dam and growth of calves born as multiples or singles. *J. Anim. Sci.* 39:589-600.

Barnea, E. 2000. Embryo maternal signaling prior to implantation. Textbook of obstetrics gynecology I. Munteanu. Argentina: SIEP.

Burges, K.; Kalph, M.; Jenekin, G.; Thorburn, G. 1990 Effect of oxytocin and estradiol on uterine prostaglandin release in nonpregnant and early pregnant ewes *Biology Reproduction* 42.

Cady, R. A.; L. D. Van Vleck. 1978. Factors affecting twinning and effects of twinning in Holstein dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 46:950-956.

Caballero, M. 2005. Inducción de gestaciones de mellizos de razas bovinas de aptitud cárnica a través de transferencia de embriones producidos in vitro a receptoras Holstein Friesian en línea. Consultado el 9 abr. 2010. Disponible en www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC2/tesis/2005/...m/.../caballero_m.pdf

Cunningham, J.G. 1997. Fisiología veterinaria. 2a. Ed. México. Interamericana McGraw-Hill.

Cutaia, L.; D. Moreno.; L. Villata.; H Tríbulo.; R Tríbulo y G.A. Bó. 2000. Sincronización de la ovulación y tasas de preñez en vacas receptoras de embriones tratadas con D.I.B y Benzoato de Estradiol. V Congreso Argentino de Reproducción Animal, Rosario, CD. Abstr.

Castellanos, J. 2007. La educación agrícola en línea. Consultado 25 nov. 2009. Disponible en <http://laeducacionagricola.blogspot.com/2007/05/tcnica-del-trasplante-de-embriones-en.html>

Catena, M. 2007. Vaca vacía- mortalidad embrionaria. Consultado el 8 de Ene. 2010. Disponible en www.vet.unicen.edu.ar/edcont2007/entornovirtual/.../Vaca%20Vacía.pdf

Cole, H.H.; Cupps P.P. 1972. Reproducción de los Animales Domésticos 3a. Ed. España. Zaragoza. 566. p.

De Armas, R.; Solano, R. 1996. Manual Práctico de Transferencia de Embriones y Fertilización *in vitro*. Centro de Investigación y Mejoramiento Animal. La Habana, Cuba. 118 pág.

De León G., R.H.; González, M. R. A. 2009. Producción de embriones in vitro a partir de ovarios post mortem. Investigación en progreso. Proyecto de Mejoramiento Genético y Biotecnología. IDIAP. Publicación en proceso.

Dickerson, G.E. 1978. Animal size and efficiency: basic concepts. Anim. Prod. 27:367-379.

Duica A.A.; Nestor Tovío L.; Henry Grajales L. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de las hembras receptoras en un programa de trasplante de embriones bovinos. En línea. Revista de Medicina Veterinaria N° 14. Consultado el 2 de abr. del 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx>

Echternkamp, S.E. y K.E. Gregory. 1999. Effects of twinning on postpartum reproductive performance in cattle selected for twin births. J. Anim. Sci. 77:48-60.

Foote, W.D. ; Thibault, C. 1969. Recherches experimentales sur la maturation *in Vitro* des ovocytes de Truie et de Veaus. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 9,329.

Fernández, E. 2005. Manual de ganadería doble propósito, en línea. Consultado el 13 oct. 2009. Disponible en www.viateca.com.

Fleming, A.D.; Khalil, W. y Armstrong, D.T. 1983. Failure of follicular fluid to inhibit oocyte maturation. J. Reprod. Fertile. 69, 665.

Gregory, K. E.; S. E. Echternkamp, G. E. Dickerson, L. V. Cundiff, R. M. Koch, y L. D. Van Vleck. 1990. Twinning in cattle: I. Foundation animals and genetic and environmental effects on twinning rate. J. Anim. Sci. 68:1867-1876.

- Gregory, K.E.; S.E Echternkamp, y L. C Undiff.** 1996. Effects of twinning on dystocia, calf survival, calf growth, carcass traits and cow productivity. *J. Anim. Sci.* 74:1223-1233.
- Guerra M.P.; Dickerson G.E.; Anderson G.B y Green R.D.** 1990. Embryo transfer twinning and performance efficiency in beef production. *J. Anim. Sci.*68: 4039-4050.
- Gomes, C.** 2005. Transferencia de embriones experiencia en Colombia. Memoria, congreso internacional de reproducción bovina. INTERVET. Bogota. Colombia sep. 2005.
- Gordon, I.** 1989. Control en la Crianza de los Animales de Granja. Compañía Editorial Continental, S.A., México, D.F.
- Gordon, I.; G. Williams. J. y Edwards.** 1962. The use of PMSG in the induction of twin pregnancy in the cow. *J. Agric. Sci. Camb.* 59: 143-198.
- García, B.** 1998. Verdades y Mentiras de la información reproductiva, IV Jornadas Nacionales CABIA y I del Mercosur.
- Gonzales, L.I.** 2008. Causas de Infertilidad en vacas Lecheras en línea. Consultado el 8 de abr. 2010. Disponible en http://www.unmsm.edu.pe/veterinaria/files/infertilidad_lluen.pdf.
- Hanarahan, J.P.** 1983. The inter-ovarian distribution of twin ovulations and embryo survival in the bovine. *Theriogenology* 20: 3-11.
- Hansson, Y.; Trygstad, O.; French, F.S.; Malean, W.; Smith, A. A.; Tindall, D. J.; Weddington, S. C.; Petrusz, P.; Nayfeh, S. N.; y Ritzen, E. M.** 1974. *Nature (London)* 250, 387
- Hafez E.** 2000. Reproduccion e inseminación de los aniamles domesticos. 7a Ed. Reproduccion Health Center IVF/Andrology International. Kiawah Island, South Carolina, USA, Interamericana. 33 – 144.
- Hafez, E.** 1987. Reproducción e inseminación artificial en animales 4a Ed. Mexico, Interamericana. 653 p.
- Hafez E.** 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5a Ed. México, interamericana. 693 p.
- Holy, L.** 1970. Biología de la Reproducción Bovina. Instituto del libro. La Havana, Cuba.

Hernández, A. 1995 Lecturas sobre reproducción bovina. Aspectos morfológicos de la implantación. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia.

Hernández, J.; Quintero, A. 1998. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. En línea. Consultado el 12 de dic del 2009. Disponible en www.egromix.com.

Henao, G. 2001. Reactivación ovárica postparto en bovinos. En línea. Consultado el 23 de abr. 2010. Disponible en <http://www.agro.unalmed.edu.co/departamentos/panimal/docs/reactivacion.pdf>.

Izake, I.; O. Susuki,; K. Shimada,; K. Fujita,; M. Kosugiyama. 1988. Twin pregnancy diagnosis and early embryonic loss after bilateral egg transfer in beef cattle. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 34: 236 - 242

Jonker F.H. 2004. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:415-430.

Leibo, S.P. 1986. Commercial production of pregnancies from one step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 25: 166

Moreno, L.; Cutaia, L.; Villata, F.; Ortisi, G. y Bó, A. 2000. Control del desarrollo folicular utilizando D.I.B., Benzoato de Estradiol y Progesterona. V Congreso Argentino de Reproducción Animal, Rosario, CD. Abstr.

Morris, C. A. 1984. A review of the genetics and reproductive physiology of dizygotic twinning in cattle. *Anim. Breed. Abstr.* 52: 803.

Manrique, J. 1990. Fisiología de la reproducción del ganado lechero en línea. Consultado el 10 de dic. 2009. Disponible en www.egromix.com.

McCracken, J.A.; Schramm, W.; Okulicz, W.C. 1984 Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂alfa from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 7: 31-55.

McDonald, 1981. Reproducción y endroquinología veterinaria 2a. Ed. Mexico. Interamericana. 466. p.

Oliphant, G.; Reynolds, S.; Smith, P.; Marta, J. 1984. Inmunocytochemical localization and determination of hormon, induced syntesis of the sulfatedovidulctal glycoproteins. *Biology Reproduction* 31.

Penny, C.D.; Lowman, N.A.; Scott, P.R.; Scott, S. Voelkel, D.A.R. y Davies. 1995. Management aspects of induced twinning in beef suckler cows using in vitro fertilised embryos. *Vet. Rec.* 136: 506-510.

Pickett, B.W.; **Back, D.G.;** **Burnwash, L.D y Voss, J.L.** 1974. Reproductive Insemination Artificial 5a Ed. p. 47.

Portillo, G. 2005. Manual de ganadería de ganadería doble propósito. Fisiología reproductiva y diferencias reproductivas entre el ganado europeo y cebú. Consultado 25 de abr del 2010. Disponible en <http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros/online/manual/ganaderia/seccion6/articulo2-s6.pdf>.

Reichenbach, H.D.; **J. Leibrich, U.;** **Berg, G y Brem.** 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. J. Reprod. Fert. 95: 363-370.

Rosell, R. 2004. Regulación Neuroendocrina del ciclo estral en los animales domésticos, en línea. Consultado 23 de abr. 2010. Disponible en www.produccion-animal.com.ar.

Rowson, L.E.A.; **J.P. Bennett;** **M.J.K. Harper.** 1964. The problem of non surgical egg transfer to the cow uterus. Vet. Rec. 76: 21 - 23.

Rowson, L. E. A.; **R. A. S. Lawson y R. M. Moor.** 1971. Production of twins in cattle by egg transfer. J. Reprod. Fert. 25: 262 - 268.

Rose E.P.; **Wilton J.W.** 1991. Productivity and profitability of twin births in beef cattle. J. Anim. Sci. 69: 3085-309.

Romage, S 1998. Cómo y por qué una vaca entra en celo en línea, consultado el 20 oct. 2009. Disponible en www.produccion-animal.com.ar

Roa, N. 2005. Manual de ganadería de ganadería doble propósito. Método y aplicación de la inseminación artificial en bovinos Reproducción Animal, en línea. Consultado el 19 de sep. 2009. Disponible en http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual.

Rodríguez, J. 2001. Mecanismos para el reconocimiento materno de la preñez en la vaca, Consultado el 8 de oct. 2009. Disponible en www.egromix.com.

Rivera, H.; **Lopez, H. y Fricke, P. M.** 2005. Use of intravaginal progesterone-releasing inserts in a synchronization protocol before timed ai and for synchronizing return to estrus in holstein heifers. journal dairy science. 88(3): 957-968.

Salverson, R. R.; **Dejarnette, J. M.;** **Marshall, C.E. y Wallace, R.A.** 2002. synchronization of estrus in virgin beef heifers using melengestrol acetate and pgf2 α : an efficacy comparison of cloprostenol and dinoprost tromethamine. theriogenology. 57.P: 853-858.

- SAS.**1999. Statistical Analysis Software. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Silva, M., R. Gatica.; J. Correa.** 2000. Inducción de mellizos mediante la transferencia de un segundo embrión ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo en vacas cubiertas en línea. Arch. Consultado el 20 de abr. 2009. Disponible en <http://www.scielo.cl>.
- Sinclair, K.D.; P.J. Broadbent, D.F.; Dolman, R.G.; Watt, J.S y Mullant.** 1995. Establishing twin pregnancies in cattle by embryo transfer. Anim. Sci. 61: 25-33.
- Sreenan, J.M.; M.G. Diskin.** 1986. The extent and timing of embryo loss in cattle. In: J.M. SREENAN y M.G. DISKIN (eds.). Embryonic mortality in farm animals, pp 1-11. Martinus Nijhoff, The Hague.
- Szollsi, D.** 1975 Ultrastructural aspects oocyte maturation and fertilization. In La Fecondation. C Thibault et9., Paris, Masson, pp, 13-35.
- Sreenan, J.M.; M.G. Diskin.** 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. Theriogenology, 27: 99 - 113.
- Sreenan, J. M., M. G. Diskin.** 1989. Effect of a unilateral or bilateral twin embryo distribution on twinning and embryo survival rate in the cow. J. Reprod. Fert. 87: 657 - 664.
- Stringfellow, D.; Siedel,** 2000. Manual de la Sociedad internacional de Transferencia de Embriones 3a. Ed. Illinois U.S.A, Ambiotec. 181. P.
- Steinberger, E.; y Steinberger, A.** 1974. In Handbook of Physiology (E. Knobil y W. H. Sawyer, eds.) Sect. 7, Vol. IV, 2, pp. 325-345. American Physiological Society, washington, D.C.
- Spencer, T.; Burghardt, R.; Johnson, G.; Bazer, F.** 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. Animal Reproduction Science 82 537-550.
- Syntex.** 2005. Fisiología reproductiva del bovino en línea, consultado el 15 de sep. 2009. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar.
- Tervit, H.R.; R.P. Elsdén.; G.D. Ferand.** 1981. Deep freezing of 7 to 8 and 10 to 11 day old cattle embryos. Theriogenology 15: 115.
- Thibault, C.** 1977. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes. J. Reprod. Fert, 51,1.

Tsafiriri, A. y Channing, C. 1975. An inhibitory influence of granulosa cell and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. *Endocrinology* 96, 922.

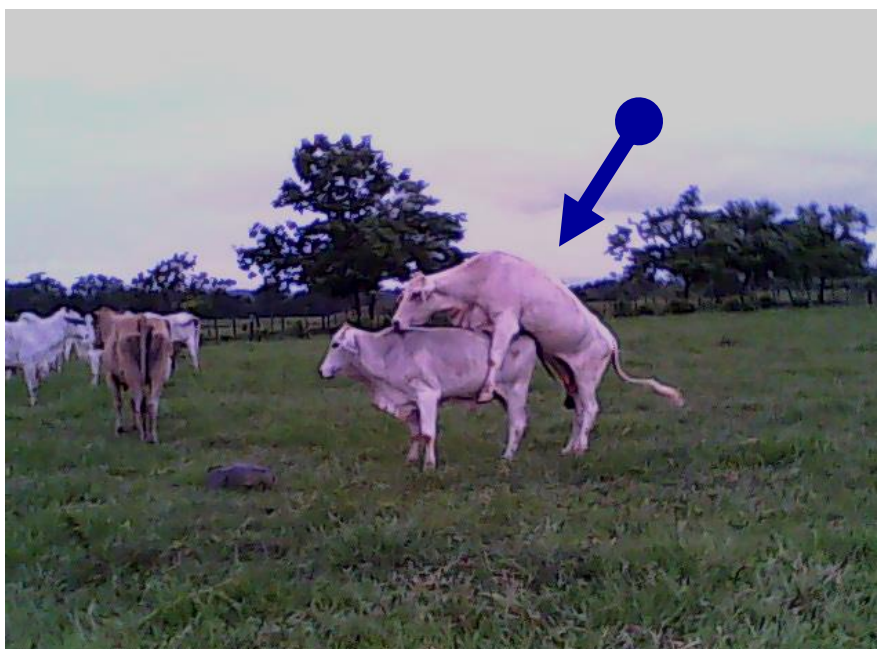
Turman, E.J, D.B.; Laster, R.E Renbarger, y D.F. Stephens. 1971. Multiple births in beef cows treated with equine gonadotropin and chorionic gonadotripin *J. Anim. Sci.* 32:962-967.

Thatcher, w.; Staples, C.; Danet, G.; Oldick, B.; Schmitt, P. 1994 Embryo health and mortality in sheep and cattle *Journal animal Science* 72.

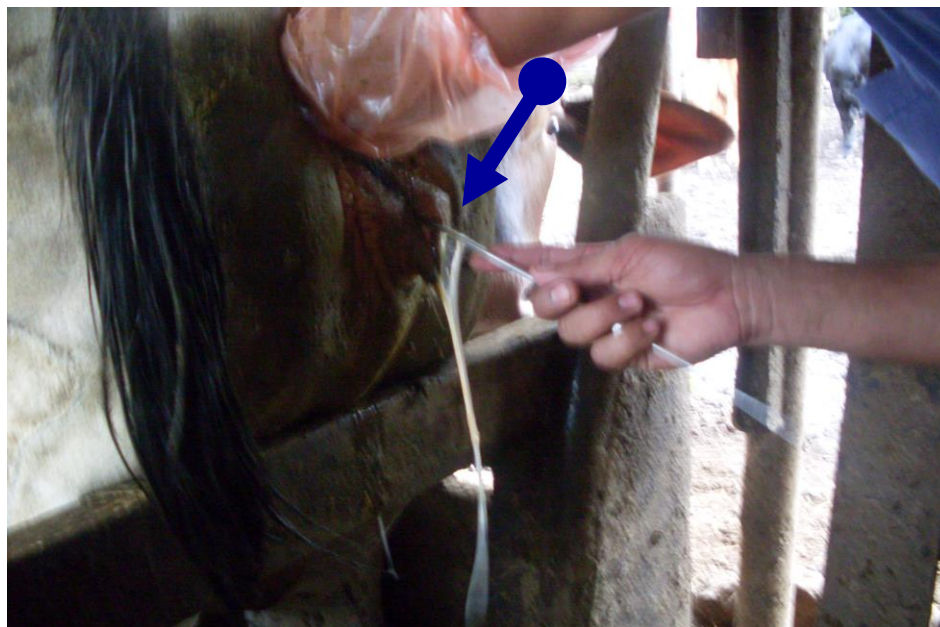
Wilkins, J.F.; D.W. Hennessy.; L.J. Cummins,; M.A. Hillard. 1992. Twin calves for commercial beef production in Australia. *Yamaguchi J. Vet. Med.* 19: 67-72.

Zollers, W.G.; Garverick, H.A.; Smith, M.F. 1989. Oxytocin-induced release of prostaglandin F_{2u} in postpartum beef cows: Comparison of short versus normal luteal phases. *Biol. Reprod.* 41: 262-267.

Zeleznik, A.J.; Midgley, A.R.; J.R.; y Reichert, L.E.; Jr. 1974. *Endocrinology* 95, 818.

ANEXO 1. PALPACION DE CUERPO LÚTEO EN VACAS SELECCIONADAS.**ANEXO 2. OBSERVACIÓN DE VACAS EN CELO.**

ANEXO 3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE VACA EN CELO.



ANEXO 4. CLASIFICACION DE LOS EMBRIONES DE FIV.

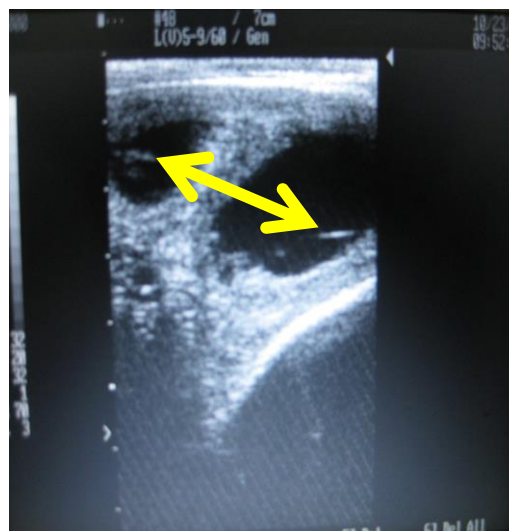
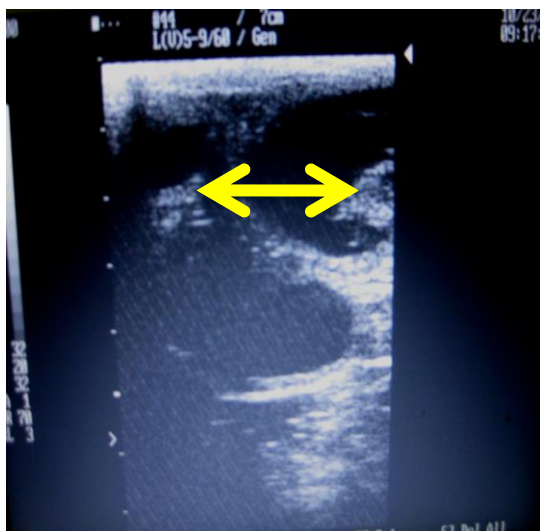


ANEXO 5. MATERIALES UTILIZADOS PARA TRASFERIR LOS EMBRIONES.**ANEXO 6. TRANSPLANTE DEL EMBRIÓN IPSILATERAL O CONTRALATERAL AL CUERPO LÚTEO.**

ANEXO 7. DIAGNÓSTICO DE CONCEPCIÓN Y GESTACIÓN POR ULTRASONOGRAFIA TRANSRECTAL.



ANEXO 8. CONCEPCIÓN OBSERVADA A LOS 30 DIAS.

ANEXO 9. DOBLE GESTACIÓN OBSERVADA A LOS 60 DIAS.**ANEXO 10. PREÑES OBSERVADA A LOS 90 DIAS DE GESTACIÓN.**