

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Creación de un banco de embriones a partir de un protocolo de superovulación, para el mejoramiento genético del hato ovino de la granja experimental de Nero

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista


Autores:

Jenny Alejandra Agudo Benavides

Jessica Maribel Tepán Rumipulla

Director:

José Luis Pesántez Pacheco

ORCID:  0000-0002-5669-6014

Cuenca, Ecuador

2023-05-10

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo valorar un protocolo de superovulación con la finalidad de crear un banco de embriones para el mejoramiento genético del hato ovino existente en la granja experimental "Nero". Para cumplir con este objetivo, se utilizaron 10 ovejas hembra de raza corriedale y katahdin y 2 machos reproductores de la raza dorper y katahdin; los animales tuvieron una condición corporal de $3 \pm 0,5$; una edad promedio de $3,5 \pm 1$ años; y un peso promedio de 60 ± 10 kg. El protocolo de superovulación empleado fue: día 0 aplicación de esponjas intravaginales con 200 mg de acetato de medroxiprogesterona (AMP); día 4 recambio de esponja; días 8 al 11 administración de FSH en dosis decreciente, equivalente a un total de 200 mg; día 10 se removió la esponja y se aplicó 25 mg de prostaglandina F2 alfa; día 12 apareamiento con 3 montas/día cada 6 h. A los 6 días de la última monta se realizó un lavado retrógrado mediante laparotomía exploratoria de los cuernos uterinos. Como resultado, el 50 % (5/10) de las ovejas respondieron al protocolo de superovulación recuperando las siguientes estructuras: mórulas= 31, blastocistos= 7, ovocitos no fecundados= 3. Asimismo, se registró un total 71 CL ($9,91 \pm 2,04$ mm) y 9 folículos ($3,88 \pm 0,33$ mm). También existió una correlación positiva ($r=0,413$, $P \leq 0,0001$) entre tamaño de cuerpo lúteo y calidad de embriones. En conclusión, la respuesta del protocolo de superovulación permitió obtener un total de 37 embriones congelables y transferibles.

Palabras clave: superovulación, ovinos, monta natural, embriones, material genético

Abstract

The objective of this study was to evaluate a superovulation protocol with the purpose of creating an embryo bank for the genetic improvement of the existing sheep flock at the “Nero” experimental farm. To meet this objective, 10 female sheep of the corriedale and katahdin breed and 2 male breeders of the dorper and katahdin breeds were used; the animals had a body condition of $3 \pm 0,5$; an average age of $3,5 \pm 1$ years; and an average weight of 60 ± 10 kg. The superovulation protocol employed was: day 0 intravaginal sponge application with 200 mg of medroxyprogesterone acetate (MAP), day 4 sponge replacement; days 8 to 11 administration of FSH in decreasing doses, equivalent to a total of 200 mg; day 10 the sponge was removed and 25 mg prostaglandin F₂ alpha was applied; day 12 mating with 3 mating/day every 6 h. At 6 days after the last mating, retrograde lavage by exploratory laparotomy of the uterine horns was performed. As a result, 50 % (5/10) of the ewes responded to the superovulation protocol recovering the following structures: morulae= 31, blastocysts= 7, unfertilized oocytes= 3. A total of 71 CL (9.91 ± 2.04 mm) and 9 follicles (3.88 ± 0.33 mm) were recorded. There was also a positive correlation ($r=0.413$, $P \leq 0.0001$) between corpus luteum size and embryo quality. In conclusion, the response of the superovulation protocol allowed obtaining a total of 37 freezable and transferable embryos.

Keywords: superovulation, sheep, natural riding, embryos, genetic material

Índice de contenido

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 13 |
| Objetivos | 15 |
| Revisión de la literatura | 16 |
| 2.1. Razas ovinas..... | 16 |
| 2.1.1. Raza corriedale..... | 16 |
| 2.1.2. Raza katahdin | 16 |
| 2.1.3. Raza dorper | 16 |
| 2.2. Aspectos reproductivos | 17 |
| 2.2.1. Fisiología ovárica..... | 17 |
| 2.3. Superovulación en ovinos..... | 22 |
| 2.3.1. Tratamientos superovulatorios | 22 |
| 2.3.2. Método natural | 27 |
| 2.4. Colecta de embriones..... | 29 |
| 2.4.1. Clasificación de embriones..... | 29 |
| 2.5. Congelación de embriones..... | 33 |
| 2.5.1. Crioprotectores | 33 |
| 2.5.2. Técnicas de congelamiento..... | 34 |
| Materiales y métodos..... | 35 |
| 3.1. Materiales..... | 35 |
| 3.1.1. Materiales de campo | 35 |
| 3.1.2. Materiales físicos | 35 |
| 3.1.3. Materiales químicos | 35 |
| 3.1.4. Materiales reactivos..... | 35 |
| 3.1.5. Materiales biológicos | 36 |
| 3.1.6. Materiales de laboratorio | 36 |
| 3.2. Metodología | 37 |
| 3.2.1. Ubicación del proyecto | 37 |
| 3.2.2. Selección de las ovejas y carneros | 37 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2.3. | Protocolo de manejo y adaptación de los ovinos..... | 38 |
| 3.2.4. | Tratamiento superovulatorio | 39 |
| 3.2.5. | Recuperación de estructuras y evaluación de la respuesta ovulatoria | 39 |
| 3.2.6. | Protocolo preoperatorio. | 40 |
| 3.2.7. | Recuperación de embriones..... | 40 |
| 3.2.8. | Clasificación de embriones..... | 41 |
| 3.2.9. | Congelación de embriones | 41 |
| 3.3. | Análisis de los resultados | 42 |
| | Resultados | 43 |
| | Discusión..... | 45 |
| | Conclusiones..... | 47 |
| | Referencias | 48 |
| | Anexos | 53 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Regulación del ciclo estral y la ovulación por las interrelaciones entre las hormonas hipotalámicas (GnRH), hipofisarias (LH y FSH), foliculares (estradiol e inhibina), lúteas (progesterona y oxitocina) y uterinas (prostaglandina). Las gonadotropinas estimulan el desarrollo folicular que produce la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo..... | 18 |
| Figura 2. Esquema del desarrollo de la fase folicular..... | 19 |
| Figura 3. Representación del esquema de desarrollo folicular y perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja. Se observa el crecimiento y la atresia de los folículos para un patrón de 3 ondas de desarrollo folicular hacia los días 0,6 y 11 (desde el reclutamiento de folículos de al menos de 2 mm de diámetro hasta su atresia u ovulación con 5 o 6 mm..... | 20 |
| Figura 4. Protocolo de sincronización utilizando progesterona y prostaglandina en hembras ovinas..... | 24 |
| Figura 5. Protocolo de sincronización utilizando prostaglandina en hembras ovinas..... | 25 |
| Figura 6. Protocolo de sincronización utilizando progesterona y gonadotropina coriónica equina (P4+eCG) en hembras ovinas..... | 26 |
| Figura 7. Esquema de diferentes etapas del desarrollo embrionario en la oveja (días post celo). (A): cigoto, (B): etapa de 2 células, (C): etapa de 4 células, (D): etapa de 8 células, (E): etapa de 16 células, (F): mórula, (G): blastocisto expandido, (H): blastocisto eclosionado, (I): embrión fragmentado..... | 32 |
| Figura 8. Disposición del embrión en la pajuela..... | 34 |
| Figura 9. Ubicación del área de estudio (Cuenca-Azuay)..... | 37 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de embriones de acuerdo con su calidad y características morfológicas propuesto por la IETS..... | 31 |
| Tabla 2: Disposición de los grupos de ovejas para el estudio realizado..... | 38 |
| Tabla 3. Descripción de la respuesta ovulatoria en ovejas corriedale y katahdin sometidas a un solo tratamiento de superovulación con 200 mg FSH..... | 43 |
| Tabla 4. Embriones recuperados en el lavado uterino de ovejas corriedale y katahdin sometidas a un solo tratamiento de superovulación con 200 mg FSH..... | 44 |

Agradecimientos

En primer lugar, queremos agradecer a Dios por darnos fortaleza y sabiduría durante nuestra carrera universitaria y permitirnos culminar en esta etapa importante en nuestra vida.

De manera especial, nuestro agradecimiento profundo al director de tesis Dr. José Luis Pesantez por ser nuestro guía principal en este proceso de aprendizaje, por su apoyo incondicional; palabras de aliento y sobre todo por su paciencia infinita. Hoy en día se ha convertido en nuestro mentor y gran amigo.

Así mismo nuestros agradecimientos al Dr. Andrés Galarza y a los técnicos del laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca quienes ayudaron en la parte práctica de nuestro estudio.

De igual manera agradecemos al director de la granja experimental Nero el Dr. Gonzalo Castro, al Dr. Jaime Loja, a los trabajadores y a los estudiantes que colaboraron generosamente.

A los doctores, Andrés Galarza, Luis Ayala, Diego Rodríguez, agradecemos su tiempo y sus recomendaciones durante la revisión de la tesis.

Jenny Agudo Benavides & Jessica Tepán Rumipulla

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios y a la Virgen por llenarme de conocimiento, sabiduría y paciencia. A mis queridos padres Inés y Mario por ser un pilar en esos momentos difíciles, por su esfuerzo y sacrificio. Además de darme ese apoyo incondicional que me impulsó a continuar para cumplir todas mis metas y sobre todo por inculcarme valores que me han ayudado a conseguir mis sueños.

A toda mi familia, especialmente a mis hermanos porque nunca me dejaron de alentar y aconsejar para obtener mis metas.

A mi compañera de tesis y amigos por compartir sus conocimientos, experiencias, por sus alegrías, por saber escucharme, comprenderme y apoyarme en todo momento.

Jessica Tepán Rumipulla

Dedicatoria

El presente trabajo de tesis va dedicado primeramente a Dios y a la virgen de la Dolorosa por guiarme y protegerme en cada una de las diferentes actividades que se ha desarrollado a lo largo de mi carrera universitaria, después a mis padres: Mario y Blanca, que con su arduo esfuerzo y sacrificio me han dado todos los medios necesarios para culminar con mis estudios, han sido la motivación constante que permiten que hoy en día ser la persona que soy, una mujer independiente y trabajadora.

A todos mis familiares, amigos y personas que han pasado por el tren de mi vida, que de una forma u otra me han sabido escuchar, apoyar y motivar para continuar preparándome profesionalmente. Además de fomentando buenos principios y valores.

A mi compañera de tesis Jessica Tepán que la considero más como una hermana, ha estado siempre y en cada ocasión me ha motivado a seguir en la lucha del día a día.

Jenny Agudo Benavides

Glosario

SOV: superovulación

IA: inseminación artificial

TE: transferencia de embriones

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación

IETS: “Internacional Embryo Transfer Society”; “Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria

mm: milímetro

mg: miligramo

ng: nanogramo

µm: micrómetro

µg: microgramo

kg: kilogramo

cm: centímetro

°C: grados centígrados

M: molar

Mcal: mega calorías

PGF2α: prostaglandina F₂ alfa

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

LH: hormona luteinizante

FSH: hormona folículo estimulante

CL: cuerpo lúteo

P4: progesterona

CIDR: dispositivo intravaginal

eCG: gonadotropina coriónica equina

FGA: acetato de fluorogestona

MAP: acetato de medroxiprogesterona

EG: etilenglicol

PBS: buffer fosfato salino

N₂: nitrógeno líquido

EC: embriones congelables

h: horas

UI: unidades internacionales

IM: intramuscular

UFOs: ovocitos no fecundados

m. s. n. m.: metros sobre el nivel del mar

Introducción

La población ovina en el Ecuador ha disminuido drásticamente en los últimos 5 años, según el último censo realizado en el año 2020 se contabilizaron 496.535 ovinos distribuidos en las diferentes regiones (costa, sierra y amazonía), en comparación con el año 2014 en donde se contabilizó 619.000 ovinos (INEC, 2020). Esta disminución se atribuye especialmente a cambios paulatinos de los objetivos de la producción de una especie doméstica a otra principalmente por la rentabilidad económica (Rubianes & Ungerfeld, 2002).

Según, Pazmiño & Rubio (2012), mencionan que los ovinos son una de las especies de menor transcendencia económica en nuestro país y son considerados como animales criollos cuyas características productivas son bajas, no obstante tienen un alto grado de rusticidad con respecto a un animal de alto valor genético, sumando a esto la falta de apoyo gubernamental ha provocado la falta de interés de los productores de aplicar algún programa de mejora genética como la introducción de una nueva raza (materna o paterna).

La superovulación (SOV) y transferencia de embriones (TE) son biotecnologías reproductivas que se aplican en el ganado bovino a gran escala, donde las técnicas pueden ser costeadas debido a la productividad (lechera o cárnica). Es por esta razón que la especie bovina ya tiene un progreso genético. Sin embargo, en la producción de ovinos y caprinos, la implementación de estas biotecnologías reproductivas es escasa o casi nula, y quizás lo único estandarizado es la inseminación artificial (IA) consiguiendo un progreso genético a largo plazo (Maciel et al., 2017).

También hay que tener en cuenta la anatomía de la especie ovina (cérnix) que es diferente a la de los otros animales domésticos (Marizancén Silva & Artunduaga Pimentel, 2017). Existen factores ligados al animal y a la biotecnología, que ocasionan respuestas variables entre animales de la misma explotación siendo estos: raza, edad, nutrición, estado reproductivo, estación del año, fuente y protocolos de administración de gonadotrofinas (González-Bulnes et al., 2004).

En nuestro país se aplican diferentes biotecnologías reproductivas en el ganado ovino. Sin embargo, no se ha dado la difusión suficiente al pequeño, mediano y gran productor debido a la falta de conocimiento de estas, el costo de hormonas y la dificultad para acceder a la biotecnología, lo que ha limitado el progreso genético en los ovinos (Ortega, 2020; Penna et al., 2014).

Con el uso de la IA, sincronización de celo, superovulación y criopreservación de embriones producidos *in vivo*, se busca intensificar el mejoramiento genético y la multiplicación de razas

e individuos de alto valor productivo, tomando como referencia este aspecto podemos decir que de un ovino en su etapa productiva se obtienen hasta 8 descendientes y con la superovulación se puede obtener una cifra superior en un menor tiempo (Gibbons & Cueto, 2013), mediante un mayor número de folículos, ovulación y por ende de embriones, obteniendo una mayor tasa de natalidad en el rebaño ovino en toda su vida productiva (Correa, 2021).

La SOV y TE mejoran la tasa reproductiva de las hembras (FAO, 2013), controlandola época de parición y aumentando la supervivencia de las crías (Aisen, 2004). La comercialización de embriones es el mejor método para distribuir genes 100 % deseados (Simonetti, 2008). Además, permite reducir la consanguinidad, el riesgo de transmisión de enfermedades, malformaciones y la eliminación de genes no deseados (Córdova Izquierdo et al., 2008). Por lo anterior expuesto, la aplicación de protocolos de sincronización y la superovulación (SOV) permitirá la creación de un banco de embriones para reactivar y potenciar la ganadería ovina con el fin zootécnico de obtener productos de alta calidad y valor (corderos, lana, carne, leche y derivados) aprovechando las características productivas como: diversidad racial, precocidad sexual, habilidad materna, adaptabilidad y productividad, primero en la granja experimental “Nero” y quizás en un futuro este material almacenado (embriones) pueda ser difundido hacia los pequeños y medianos productores considerados como prioritarios en el País.

Objetivos

Objetivo general

Valorar un protocolo de superovulación, con el fin de crear un banco de embriones para el mejoramiento genético del hato ovino de la granja experimental de Nero.

Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta a un protocolo de superovulación establecido, a través de la producción de embriones transferibles y congelables en la especie ovina.
- Crear un banco de material biológico (embriones) para favorecer la preservación y la diversidad genética.

Revisión de la literatura

2.1. Razas ovinas

2.1.1. Raza corriedale

Desarrollada en Nueva Zelanda mediante el cruce de la raza Lincoln, Leicester y Merino. Es una raza de doble propósito (lana y carne), caracterizada por ser de tamaño mediano a grande con una buena calidad de carcasa, con una fácil adaptación a condiciones de crianza extensivas o semiextensivas (García Guillermo, 2000). Estos ovinos sobresalen por su buen desarrollo corporal, rusticidad y de resistencia a condiciones climáticas extremas. Se define por la finura de su lana de 26,31 micrones de diámetro y con un peso de vellón de 4 a 6 kg. Sus indicadores reproductivos sobresalen por tener una buena fertilidad y por producir mayor cantidad de corderos. El peso adulto de un macho fluctúa de 80 a 130 kg, el peso de las hembras de 60 a 80 kg, el peso al nacimiento es de 5 kg y el peso al destete de 28,8 kg (Mujica, 2005).

2.1.2. Raza katahdin

Esta raza se caracteriza por ser de tamaño mediano, resistentes y de fácil adaptabilidad medioambiental desarrollando así en climas fríos una capa de pelo gruesa, son tolerantes al calor y a la humedad. Las hembras tienen una habilidad maternal excepcional, en condiciones óptimas se aparean desde los 6 meses de edad, presentan un 45 % de partos simples, un 42,5 % de partos dobles y un 12,5% de partos triples. Altamente prolíficos y precoces teniendo como promedio 1,8 partos por año. Las hembras adultas pesan de 60 a 70 kg, el macho de 80 a 115 kg, al nacimiento 4,3 kg y la circunferencia escrotal del macho es de 33,89 cm (Lucio et al., 2018).

2.1.3. Raza dorper

Esta raza es originaria de Sudáfrica resultado del cruce de la raza Dorset horn con la raza persa de cabeza negra, posee una excelente velocidad de crecimiento, conformación y rendimiento de canal, de fácil adaptación a distintas condiciones ambientales y una facilidad de madurez a una edad temprana. Es una raza de pelo con un alto grado de rusticidad y que demuestra gran facilidad de transformar el forraje a carne. Las hembras tienen una alta vida productiva, buena habilidad materna, facilidad de parto, muy prolífica reportando 1,5 crías por parto y las hembras entran en celo en cualquier época. Los machos adultos alcanzan un peso de 110 a 136 kg y las hembras de 90 a 102 kg (Verdoljak, 2017).

2.2. Aspectos reproductivos

En la hembra ovina la duración de la estación sexual varía con la duración del día, raza y nutrición. La fertilidad y prolificidad en los ovinos asciende con la edad, su máxima expresión está entre los tres a seis años, luego comienza su descenso de forma gradual.

2.2.1. Fisiología ovárica

2.2.1.1. Ciclo estral de la oveja

El ciclo estral es un conjunto de procesos anatómicos, hormonales y de comportamiento que se repite sucesivamente (Gordón, 2017), la dinámica hormonal está regulada por el hipotálamo (mediante la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas), la hipófisis (secretando a la hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante), el cuerpo lúteo (que secreta progesterona y oxitocina) y el útero (responsable de la producción de prostaglandina $F_{2\alpha}$) (Atuesta & Gonella Diaza, 2011). Las ovejas adultas presentan celos cada 16 a 17 días (14 - 15 días pertenecen a la fase lútea y 3 - 4 días a la fase folicular). El estro será más corto al principio y al final de la estación reproductiva, con la presencia del macho y en la primera estación reproductiva de las hembras jóvenes (Chile, 2008). La duración varía dependiendo de la raza, etapa de la estación reproductiva y las condiciones del medioambiente. Además, se señalan diferencias entre las ovejas con partos simples o dobles (Dickson et al., 2017).

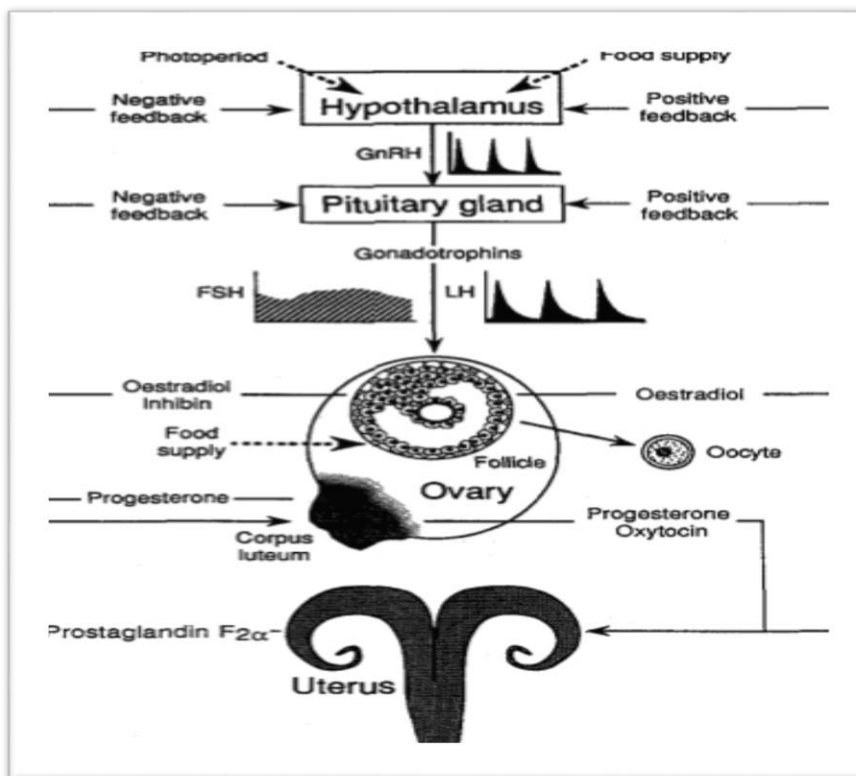


Figura 1. Regulación del ciclo estral y la ovulación por las interrelaciones entre las hormonas hipotalámicas (GnRH), hipofisiarias (LH y FSH), foliculares (estradiol e inhibina), lúteas (progesterona y oxitocina) y uterinas (prostaglandina). Las gonadotropinas estimulan el desarrollo folicular que produce la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo. Obtenido de Scaramuzzi et al., (1993).

2.2.1.1.1. Fase folicular

Tiene una duración de 3 a 4 días, esta etapa se extiende desde la luteólisis hasta la ovulación y comprende la fase del proestro y del estro. Durante esta fase la estructura ovárica está compuesta por el folículo preovulatorio el cual produce gran cantidad de estradiol.

El proestro, tiene una duración de 2 a 3 días. Se caracteriza por las caídas de las concentraciones plasmáticas de progesterona (P_4) disminuyen por debajo de 1 ng/ml, por consecuencia de la acción de la prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) que provoca la luteólisis del cuerpo lúteo (CL), permitiendo el aumento de la frecuencia de pulsos de secreción de hormona luteinizante (LH), que conlleva al aumento de la concentración del estradiol en el torrente sanguíneo (Atuesta & Gonella Diaz, 2011).

El estro o celo tiene una duración de 24 a 36 h, está asociada al aumento de la concentración plasmática de estradiol sintetizada por los folículos en crecimiento, el aparato reproductivo se prepara para las manifestaciones del estro o calor, se puede ver edema de la vulva y las

glándulas comienzan a producir mucus (Aisen, 2004; Gordón, 2017). Entre otros signos bien marcados está la búsqueda del macho y la pasividad ante la monta, movimiento de la cola, inquietud, aumento de la fonación y micción, vulva edematosa y excreción de moco por la vagina (Chile, 2008). La ovulación de la oveja se genera de manera espontánea y ocurre entre 24 a 30 h después del inicio de las manifestaciones conductuales (Simonetti, 2008).

El incremento de estradiol plasmático produce un aumento de la concentración de LH hasta alcanzar un pico de 12 h, desencadenando el pico preovulatorio de LH. El folículo maduro produce la hormona inhibina, cuya función es inhibir la liberación de FSH evitando el crecimiento folicular (Aisen, 2004).

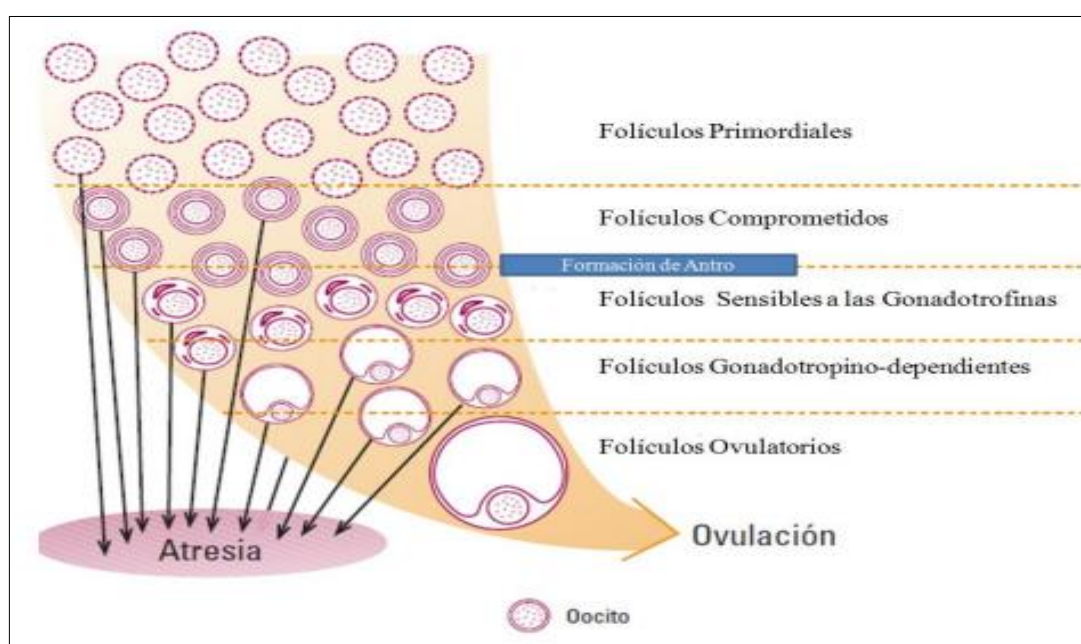


Figura 2. Esquema del desarrollo de la fase folicular. Obtenido de (Scaramuzzi et al., 1993).

2.2.1.1.2. Fase lútea

Se extiende desde la ovulación hasta la luteólisis, con una duración de 12 a 14 días, en esta fase el folículo ovulado se convierte en una estructura endócrina que toma por nombre cuerpo amarillo o cuerpo lúteo (CL). Esta fase comprende el metaestro y el diestro.

El metaestro tiene una duración de 2 días, es el periodo que sigue al estro, momento en que se inicia el desarrollo del CL, una estructura que se forma en el ovario responsable de la producción de la P_4 , la cual es encargada de mantener la gestación (Chile, 2008). El diestro es la fase más extensa se caracteriza por la secreción de P_4 sintetizada por un CL funcional (Aisen, 2004), continúa durante toda la fecundación o puede generarse una luteólisis con el fin de iniciar una nueva onda folicular (Simonetti, 2008).

2.2.1.1.3. Desarrollo de ondas foliculares

El número de ondas foliculares en un ciclo puede variar en caprinos entre 2 a 5 ondas y en ovinos de 3 o 4 pero con mayor frecuencia se desarrollan 3 ondas, el control de la dinámica folicular es realizada por las gonadotropinas (FSH y LH) en interacción con la P_4 , los niveles altos a los normales durante la fase lútea favorecen el recambio folicular. En la fase folicular los niveles de FSH controlan el número de folículos que crecen, pero existen otros factores (genéticos, nutricionales, relaciones endocrinas entre folículos, etc.) que ayudan a regular la tasa ovulatoria. Los niveles de FSH es controlado por los estrógenos y la inhibina (Aisen, 2004).

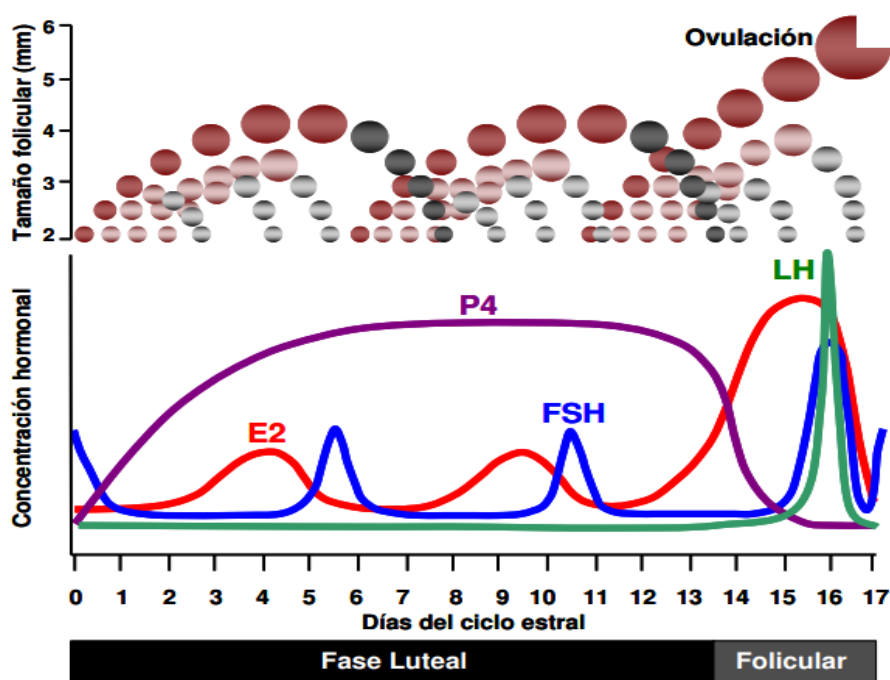


Figura 3. Representación del esquema de desarrollo folicular y perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja. Se observa el crecimiento y la atresia de los folículos para un patrón de 3 ondas de desarrollo folicular hacia los días 0,6 y 11 (desde el reclutamiento de folículos de al menos de 2 mm de diámetro hasta su atresia u ovulación con 5 o 6 mm. Obtenido de Simonetti, (2008).

2.2.1.2. Factores que regulan el ciclo estral

2.2.1.2.1. Fotoperiodo

La actividad reproductiva en ovinos se va a desarrollar en función de la cantidad de horas luz (fotoperiodo), en el hemisferio norte en zonas cercanas a la línea ecuatorial los cambios del fotoperiodo son menos marcados, siendo la época de reproducción influenciada por otros factores como: temperatura, precipitación y disponibilidad de alimento (Aisen, 2004).

Los animales utilizan diversas señales externas permitiéndoles adaptarse a las diferentes estaciones del año acumulando reservas de grasa y desarrollando pelajes adecuados (Lincoln, 1992).

2.2.1.2.2. Nutrición

La administración de alimentos suplementados con un alto nivel energético generalmente con granos con raciones que van de 140 a 450 g. denominado “flushing” entre 2 a 3 semanas previas al empadre inducen un aumento en la condición corporal, con el fin de aumentar la tasa de ovulación y la sobrevivencia del embrión (Gordón, 2017). En cabras y ovejas con una dieta restringida se retrasa el inicio del estro, reduce la tasa de ovulación y disminuye el porcentaje de gestación en comparación con dietas nutricionales adecuadas.

2.2.1.2.3. Estrés

Los factores ambientales con altas, bajas temperaturas y un mal manejo pueden retrasar o suprimir el estro consecuentemente se disminuye la tasa de ovulación. Además, pueden afectar los tratamientos de sincronización de celo.

2.2.1.2.4. Efecto macho

La presencia de los machos cerca de las hembras con programas de sincronización de celo pueden afectar negativamente en los porcentajes de estros sincronizados (Córdova-Izquierdo et al., 2008). Esto es provocado porque el macho estimula la secreción de gonadotrofinas en las ovejas principalmente la secreción de LH, hormona que estimulan la ovulación, generando el inicio del celo en las ovejas e induciendo el celo a otras del grupo (Chile, 2008).

2.3. Superovulación en ovinos

La superovulación generalmente está asociada a la transferencia de embriones, fue denominada con el término MOET (“multiple ovulation and embryo transfer”). Los tratamientos de superovulación tienen la finalidad de aumentar la tasa ovulatoria en las hembras donantes, para luego recuperar y transferir los embriones, directamente o tras su conservación a otras hembras de la misma especie, pero de menor valor, las cuales actúan como receptoras para llevar a cabo la etapa de gestación. La aplicación de la técnica de superovulación tiene como finalidad: mejorar la genética del rebaño; conservar la especie, raza o individuo; difundir los genes de interés zootécnico; comercializar el material genético; reducir el riesgo de transmisión de enfermedades y apoyar a otras técnicas reproductivas (Harasymowycz et al., 2014; Arcaus, Juanena, & Perera, 2014).

La técnica es atractiva, pero tiene varias limitantes lo que genera su escasa difusión. Los costos elevados y el número de embriones que se obtiene por hembra y por tratamiento es reducido. Otro inconveniente radica en que no todas las hembras responden al tratamiento de superovulación.

El aumento de la tasa ovulatoria tras el uso de tratamientos se da por la relación entre distintas hormonas del eje endócrino hipófisis-ovario que presentan un efecto estimulante (FSH - LH) o inhibidor (estrógenos - inhibina) sobre el desarrollo de los folículos ováricos.

2.3.1. Tratamientos superovulatorios

El tratamiento hormonal consiste en simular los acontecimientos endocrinos que regulan el ciclo sexual de la oveja, con la finalidad de inducir el celo y estimular el crecimiento y la ovulación de folículos en un momento determinado. La sincronización del estro aumenta la cantidad de folículos reclutados, además de generar un diámetro máximo y una mayor tasa de crecimiento de folículos grandes.

En los protocolos de superovulación existe una combinación de un tratamiento de sincronización del ciclo estral (progestágenos y/o prostaglandinas) y un tratamiento de estimulación ovárica (gonadotrofinas).

2.3.1.1. El tratamiento de sincronización

2.3.1.1.1. Sincronización utilizando progestágenos

La progesterona (P_4) y sus análogos sintéticos poseen un mayor efecto biológico en la regulación del ciclo estral de los ovinos, por lo que puede ser suministrado en dosis bajas. La P_4 producida naturalmente por un CL tiene como función inhibir la acción de las

gonadotrofinas (principalmente de la LH) y como consecuencia suprime el desarrollo normal folicular y la ovulación. Posee un periodo de acción corta ya que se metabolizan rápidamente.

Son varios los progestágenos disponibles en el mercado los más utilizados en ovinos son el acetato de fluorogestona (FGA) y el acetato de medroxiprogesterona (AMP). En comparación con el AMP, el FGA tiene un control más preciso de la actividad ovárica, en especial cuando se realiza la IA. Pueden ser suministrados mediante inyecciones diarias, alimentación, implantes subcutáneos o dispositivos intravaginales en particular las esponjas vaginales, constituyen el vehículo más común y práctico de administración de progestágenos. En general la duración de tratamiento con AMP es de 10 - 16 días y el tratamiento con FGA de 12 - 15 días (Azevedo et al., 2006).

Los implementos más utilizados en la sincronización de celo en ovejas son las esponjas vaginales, a las cuales se les puede impregnar AMP o FGA. El propósito de la colocación de esta esponja por vía intravaginal es provocar un efecto similar al generado con la P_4 naturalmente, esto es, la inhibición del celo independientemente de la época del año o del momento del ciclo estral en el que se encuentre la oveja. La esponja permanece en la vagina durante un periodo de 12 a 14 días, en este tiempo va liberando el progestágeno seleccionado, el cual inhibe la secreción de GnRH bloqueando así la ovulación (Abecia et al., 2012).

Protocolo de sincronización con progestágenos.

Progesterona + Prostaglandina (P_4 + $PGF_{2\alpha}$).

Se inserta vía intravaginal el dispositivo liberador de progestágeno sintético o natural (tampón, esponja o dispositivo subcutáneo) con 30 – 60 mg ya sea AMP o FGA, el cual debe de permanecer por 9 días (dispositivo subcutáneo) o 9 a 14 días (tampón o esponja). Al insertar o retirar el dispositivo se aplica una dosis de $PGF_{2\alpha}$ vía IM, al retirar el dispositivo se suprime la P_4 y se anula la inhibición de GnRH. Después de aplicar la $PGF_{2\alpha}$ se espera que el estro aparezca a las 36 a 48 h y 10 h después la ovulación. Este protocolo ha generado partos gemelares, pero a su vez manifiesta una baja tasa de fertilidad y parición por presentar estros infértiles.

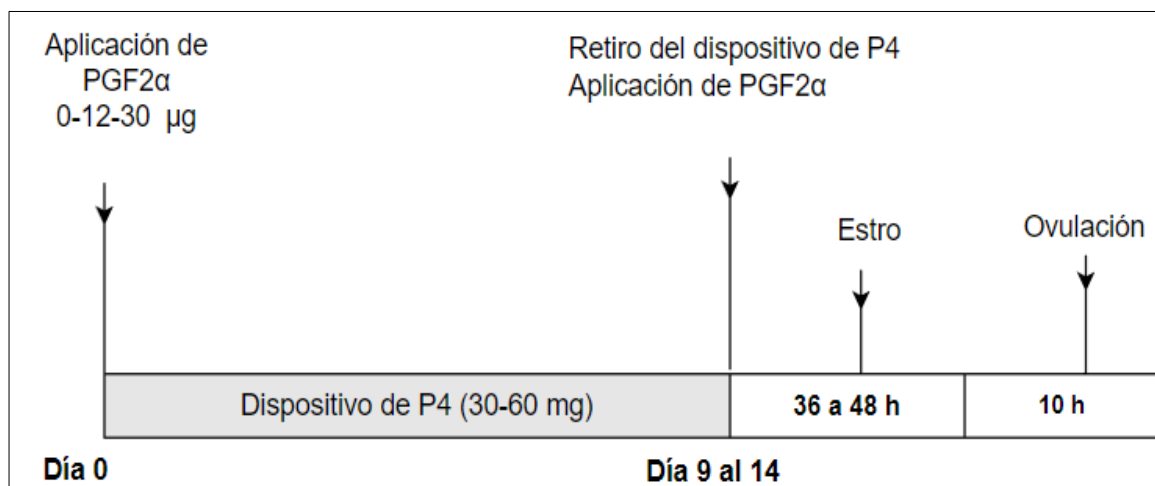


Figura 4. Protocolo de sincronización utilizando progesterona y prostaglandina en hembras ovinas. Adaptado de Lozano González et al., (2012).

2.3.1.1.2. Sincronización utilizando prostaglandina

La finalización simultánea de la fase lútea está realizada por la prostaglandina $F_{2\alpha}$ y su función principal es inducir la regresión del CL, este fenómeno se da por la disminución del riego sanguíneo al parénquima luteal privando al cuerpo CL de nutrientes y sustratos. En la mayoría de los animales la administración de $PGF_{2\alpha}$ o sus análogos sintéticos como la cloprostenol, dinaprost o delprostenate provocan la lisis del CL desencadenando una nueva fase folicular, este método es efectivo cuando existe la presencia de un CL activo.

La $PGF_{2\alpha}$ provoca la disminución de los niveles circulantes de P_4 en bovinos, ovinos, porciones y humanos *in vivo*, el cual favorece al folículo ovulatorio crecer y secretar estradiol permitiendo de esta manera generar cambios de comportamiento asociados con el inicio del estro.

Para una mayor eficacia se utiliza dos inyecciones con un intervalo de 11 a 12 días, pero en otros estudios demuestran que con un intervalo de 7 días se obtienen un porcentaje del 100 % de celo. La primera inyección genera la luteólisis en aquellas hembras con un CL funcional; la segunda inyección provocará en todas las hembras la aparición de los celos y la ovulación (Aisen, 2004; Azevedo et al., 2006; Arcaus, Juanena & Perera, 2014; Atuesta & Gonella Diaz, 2011).

Protocolo de sincronización con prostaglandina.

Este protocolo consiste en aplicar vía IM 10 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en dos dosis con un intervalo de 7 a 12 días entre dosis, luego de la última aplicación el estro aparecerá a las 25 a 48 h y la ovulación se presenta de 10 a 12 luego de iniciado los signos del estro.

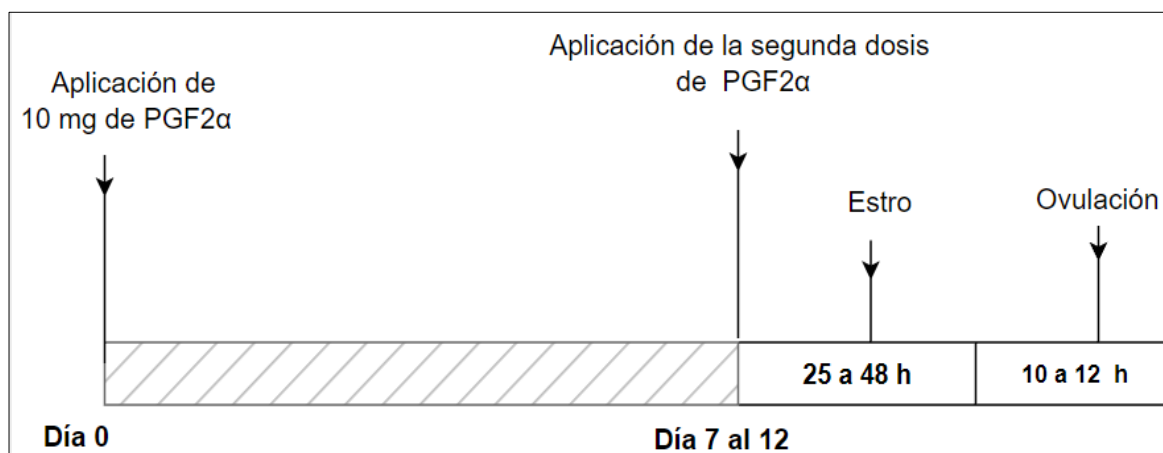


Figura 5. Protocolo de sincronización utilizando prostaglandina en hembras ovinas. Adaptado de Lozano González et al., (2012).

2.3.1.2. El tratamiento de estimulación ovárica

En las ovejas el reclutamiento de los folículos antrales está dado por la presencia de la FSH endógena y el proceso culmina cuando el folículo dominante produce inhibina y estradiol. En la superovulación las gonadotropinas suplementadas tienen como propósito aumentar el número de folículos que ovulan, esto es posible mediante la unión y activación de los receptores de FSH de las células de la granulosa presentes en los folículos.

El aumento de la tasa ovulatoria está relacionado con el reclutamiento de folículos más pequeños, el tamaño mínimo para ser reclutados es de 0,8 mm. Según Simonetti, (2008) los folículos deben de tener un tamaño mínimo de 3 mm para ser viables, mientras aquellos con una medida inferior suelen asociarse a mayores tasas de degeneración embrionaria.

La superovulación en ovinos se realiza mediante el empleo de diferentes fuentes hormonales, las más utilizadas son: la Gonadotropina coriónica equina (eCG) y la Hormona folículo estimulante (FSH).

2.3.1.2.1. Superovulación con gonadotropina coriónica equina (eCG)

La eCG es una gonadotropina no hipofisiaria más empleada en protocolos de superovulación por su bajo costo y por su sencilla administración (una sola dosis) disminuyendo de esta

manera el estrés en los animales, que suele ser perjudicial en el rendimiento productivo. La eCG tiene una larga vida media aproximadamente de 72 horas, por su alto contenido de ácido siálico (el ácido brinda una mayor protección evitando su degradación) (Gordón, 2017).

Esta hormona genera un mayor crecimiento folicular, la secreción y la multiplicación de las células de la granulosa e induce la liberación de LH, provocando una mayor tasa de ovulación (Sanchez Muñoz et al., 2014). Según Simonetti, (2008), esto se debe porque tiene una actividad tanto de FSH (80 %) como de LH (20 %).

En ovinos se recomienda que la aplicación de la eCG intramuscular se realice al momento que se está siendo retirada la esponja intravaginal (Gibbons & Cueto, 2013). Se ha observado que dosis elevadas de eCG ha provocado efectos negativos ocasionado por su persistencia en la circulación, haciendo que el periodo de ovulación sea más largo e induce a su desincronización creando así fallos en el proceso de fertilización y/o recuperación (Simonetti, 2008).

Protocolo de sincronización con prostaglandina.

Progesterona + Gonadotropina coriónica equina (P4+ eCG).

La P4 se maneja al igual que en el protocolo con PGF_{2α}, luego de retirar el dispositivo se aplica la eCG con una dosis de 250 a 400 UI vía IM como dosis única, en ovinos la dosis efectiva es de 550 a 600 UI, el estro se manifiesta a las 36 a 48 h después de retirado el dispositivo y aplicada la dosis, mientras que la ovulación se presenta 10 a 12 h después del estro.

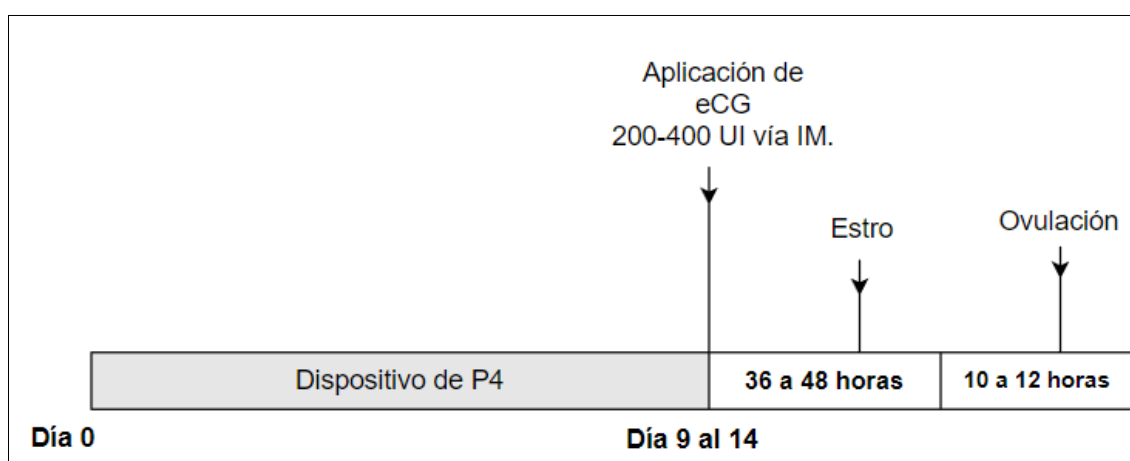


Figura 6. Protocolo de sincronización utilizando progesterona y gonadotropina coriónica equina (P4+eCG) en hembras ovinas. Adaptado de Lozano González et al., (2012).

2.3.1.2.2. Superovulación con la hormona folículo estimulante (FSH)

La FSH es sintetizada en la hipófisis anterior. Esta hormona estimula el crecimiento y la maduración folicular de los ovocitos, actúa en los folículos maduros estimulando la presentación de receptores de LH e interrumpe la liberación de los estrógenos. La FSH tiene una vida media corta (3 – 5 h), por lo que necesita una administración frecuente para mantener concentraciones séricas capaces de generar una respuesta superovulatoria (Gibbons & Cueto, 2013). Por ello, se recomienda su aplicación cada 12 h durante 2 a 4 días en dosis preferentemente decrecientes, con la administración de dosis múltiples se ha obtenido una mayor tasa ovulatoria, respuesta ovárica total, ovocitos y embriones recuperados y transferibles. La última inyección debe ser administrada 12 a 24 h después de haber terminado el tratamiento con progestágenos (Azevedo et al., 2006).

Los tratamientos de superovulación con FSH resultan estresantes para los animales debido a las dosis constantes de aplicación (dos veces). Además, resulta laborioso desde el punto de vista técnico (mano de obra) y conllevar errores en la dosificación y en los tiempos de inyección (D'Alessandro, Martemucci, & Taibi, 2005).

En el mercado la FSH se encuentra disponible a partir de extractos de hipófisis purificados (se les ha removido la LH) de especie ovina o porcina (Morales Gordón, 2016). En los productos comerciales existen variaciones entre la relación FSH: LH. Pluset® (FSH porcina) posee cantidades similares de FSH y LH una relación de 1:1. Folltropin® (FSH porcina) la cual posee aproximadamente 80% LH y Ovagen® (FSH ovina) extracto más purificado con baja concentración de LH (Abecia & Forcada Miranda, 2010).

2.3.2. Método natural

2.3.2.1. Monta Natural

Al introducir un grupo de machos al momento de retirar el dispositivo progestágeno o la administración de prostaglandina, puede inducir el estro y consecuente ovulación. Además, de provocar un grado de sincronía estral esto es provocado por la interacción con las feromonas sexuales por parte del macho.

Previamente seleccionado el macho ovino para la reproducción de acuerdo con el objetivo de producción y sus características fenotípicas y genotípicas se procede a la fecundación mediante la deposición de los espermatozoides en una hembra en celo en el momento oportuno. La receptividad sexual o la aceptación de la monta se caracteriza cuando la hembra se queda quieta permitiendo el coito (IICA, 2015).

2.3.2.2. Inseminación artificial

La IA es una de las primeras biotecnologías reproductivas que permite el uso de machos genéticamente superiores con fines de reproducción. Esta técnica involucra la colección de eyaculados de semen de animales reproductores, su dilución, congelamiento y deposición en el tracto reproductivo de la hembra, por un método que no sea el apareamiento natural. Se debe prestar mucha atención al momento de realizar la IA en pequeños rumiantes ya que hay que considerar, varios factores que afectan la fertilidad en esta especie. Por ejemplo, la disposición anatómica del cérvix y de los procesos de dilución - conservación tanto del semen refrigerado como del congelado (Balcázar-Sánchez & Porrás-Almeraya, 2009).

Tipos de inseminación artificial.

Inseminación artificial vaginal

Es un método simple y rápido que incluso se puede realizar cuando el animal está en la manga en estación, consiste en depositar el semen fresco (más de 300 millones de espermatozoides / ml) en la vagina anterior, con todas las medidas de limpieza.

Inseminación artificial cervical

Esta técnica se puede realizar con semen congelado a una concentración de 200 a 400 millones de espermatozoides por dosis con un volumen de 0,2 ml por oveja o cordera inseminada (Molina et al., 2020). Se realiza por medio de un espéculo, el cual se introduce lentamente en la vulva, se localiza el orificio externo del cuello uterino en donde va a ser depositado el material espermático. Este método es rápido, eficaz y el porcentaje de preñez obtenido con semen fresco y una dosis de 100 a 150 millones de espermatozoides varía entre el 60 y 70 % (Gibbons & Cueto, 2012).

Inseminación artificial transcervical

Esta consiste en atravesar el cérvix y depositar el semen dentro de la luz uterina. Se ubica a la oveja en una camilla, se introduce el vaginoscopio hasta el fondo de la vagina, luego se localiza la entrada del cuello uterino (cérvix) y posteriormente se deposita el semen (Aisen, 2004; Gordón, 2017). El porcentaje de preñez con este método varía entre 60 y 70% (Gibbons & Cueto, 2013).

2.4. Colecta de embriones

La metodología empleada para la obtención de embriones consiste en realizar una laparotomía media y determinar la respuesta ovulatoria (conteo de cuerpos lúteos), exponer el útero y mediante una sonda Foley introducir un medio líquido adecuado para producir una corriente de arrastre (“lavado o flushing”) a través de los cuernos uterinos. Se utiliza un medio comercial en base a PBS (Solución Buffer Fosfato), al que se le debe adicionar un 10 % de suero adulto bovino, ovino o caprino inactivado. Para la obtención de suero, se sangra un animal en forma aséptica con material esterilizado. El suero se centrifuga a 2000 g durante 15 minutos. Se toma el sobrenadante y se realiza una segunda centrifugación. Se filtra por membrana de 0,22 µm. La inactivación de la proteína complemento se realiza en baño de agua a 56 °C durante 30 minutos. El suero filtrado inactivado se puede conservar durante un año a -20 °C. En ovejas, la colecta de embriones se realiza en los días 6^{to} y 7^{mo} después de la última inseminación artificial (Gordón, 2017).

Según (Gibbons & Cueto, 2013a) las colectas embrionarias se realizan en los días mencionados debido a los siguientes fundamentos:

- Los embriones están en el tercio superior de los cuernos uterinos.
- Presentan la zona pelúcida, necesaria como barrera sanitaria.
- La congelación se realiza en estado de mórula compacta o blastocisto.

Una vez haya finalizado el lavado, el líquido recolectado en el filtro de colección es colocado en una placa Petri y se evalúa bajo estereomicroscopía, la búsqueda de los embriones se realiza bajo aumento de (10 - 20X). Una vez localizados e identificados los embriones son aspirados mediante una micropipeta y colocados en una placa con un medio de mantenimiento, protegiéndolos de la luz y temperatura del laboratorio. Finalizada la búsqueda se procede a realizar la clasificación de los embriones observándolos con un mayor aumento (40X) (Aisen, 2004; Gibbons & Cueto, 2013). Para el manejo del embrión es indispensable utilizar medios e insumos no tóxicos y estériles (Gordón, 2017).

2.4.1. Clasificación de embriones

La clasificación se realiza teniendo en cuenta dos parámetros, el primero define su estadio de desarrollo y el segundo su calidad morfológica e integridad del embrión, a cada embrión se le asigna un grado (1, 2, 3 y 4) siguiendo los estándares de la International Embryo Transfer Society (IETS). El grado 1 y 2 serían transferibles en fresco y/o congelables, el grado 3 sería solo transferible y con una expectativa de preñez menor, el grado 4 no son transferibles (Aisen, 2004). Al evaluar el estadio de desarrollo se debe de observar una correcta simetría

en el tamaño de las blastómeras, la compactación, el color y la vacuolización. En la calidad morfológica se debe observar la forma esférica y la integridad de la membrana pelúcida (Bó & Mapletoft, 2013; Gonzáles Rosales & Quezada Moscoso, 2016). La calidad morfológica es una estimación de la predicción de sobrevivencia embrionaria (Gibbons & Cueto, 2013).

2.4.1.1. Grado de desarrollo

Ovocito sin fecundar (**Código 1**)

Mórula temprana (**Código 2**): masa que contiene entre 8 - 16 células, se puede contarlas mismas.

Mórula (**Código 3**): masa que tiene alrededor de 16 células, siendo difícil de distinguirlos blastómeros entre sí, ocupando la mayor parte del espacio perivitelino.

Mórula compacta (**Código 4**): los blastómeros se han unido para formar una masa compacta la cual ocupa el 60 - 70% del espacio perivitelino.

Blastocito temprano (**Código 5**): se ha formado el blastocele y da una apariencia general de un anillo. El embrión ocupa del 70 al 80 % del espacio perivitelino. Es difícil diferenciar la masa de la célula interna de las células trofoblásticas en este momento.

Blastocisto (**Código 6**): es evidente la diferenciación de la capa trofoblástica externa y la masa celular interna que es más compacta y oscura. El blastocele es muy prominente, el embrión ocupa mayor parte del espacio perivitelino. La diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna es posible en esta etapa de desarrollo.

Blastocisto expandido (**Código 7**): el diámetro total del embrión aumenta con un adelgazamiento concurrente de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su espesor original.

Blastocisto eclosionado (**Código 8**): comienza el proceso de eclosión o puede haber eliminado completamente la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados pueden ser esféricos con un blastocele bien definido o puede estar colapsado.

2.4.1.2. Calidad embrionaria

Excelente o Bueno (**Código 1**): masa embrionaria simétrica y esférica, los blastómeros y la zona pelúcida uniformes y al menos el 85% de la masa embrionaria debe estar intacta y viable.

Regular (**Código 2**): embriones con moderada irregularidad tanto en la forma general de la masa embrionaria y zona pelúcida; al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta y viable.

Pobre o Malo (**Código 3**): los embriones tienen irregularidades importantes en la forma de la masa embrionaria y zona pelúcida; al menos el 25 % de la masa embrionaria debe estar intacta y viable.

Muerto o Degenerado (**Código 4**): embriones con irregularidades y malformaciones marcadas inviábiles.

Tabla 1. Clasificación de embriones de acuerdo con su calidad y características morfológicas propuesto por la IETS.

| Según su estadio desarrollo | | Según su calidad | |
|-----------------------------|-----------------------|------------------|-------------------|
| Código | Característica | Código | Característica |
| 0 | sin fertilizar (UFO) | 1 | excelente/bueno |
| 1 | 2- 4 células | 2 | Regular |
| 2 | 8 células | 3 | pobre/malo |
| 3 | 16 células | 4 | muerto/degenerado |
| 4 | mórula compacta | | |
| 5 | blastocisto temprano | | |
| 6 | Blastocisto | | |
| 7 | blastocisto expandido | | |
| 8 | blastocisto extruido | | |

Fuente: Aisen, (2004).

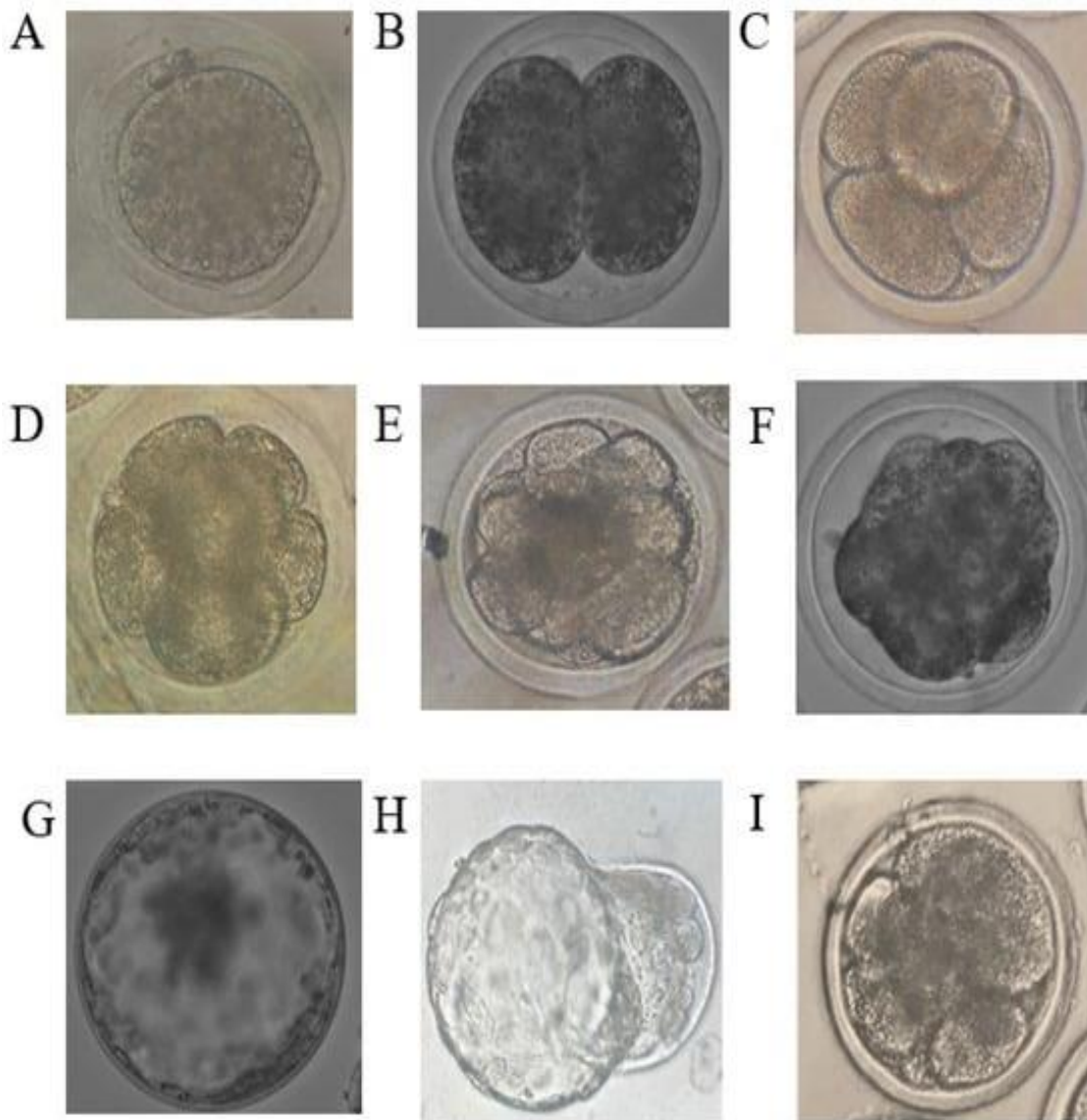
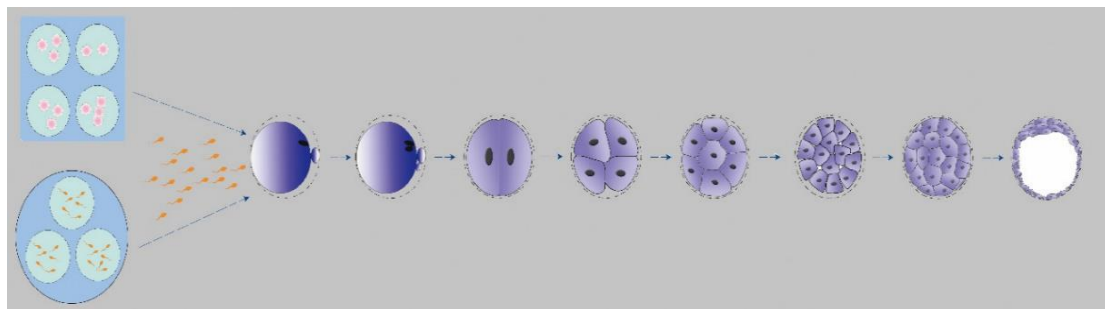


Figura 7. Esquema de diferentes etapas del desarrollo embrionario en la oveja (días post celo). (A): cigoto, (B): etapa de 2 células, (C): etapa de 4 células, (D): etapa de 8 células, (E): etapa de 16 células, (F): mórula, (G): blastocisto expandido, (H): blastocisto eclosionado, (I): embrión fragmentado. Obtenido de (Alotaibi et al., 2022; Wang et al., 2022).

2.5. Congelación de embriones

El congelamiento de los embriones ovinos y caprinos ha permitido mantenerlos en N₂ por largos periodos lo que ha consentido la comercialización internacional y la difusión mundial del material genético. Este método consiste en someter a las células embrionarias a cambios osmóticos mediante la agregación de crioprotectores (polialcoholes) capaces de penetrar en las células por difusión simple retardando la formación de cristales de agua por medio del descenso del punto de congelación. La viabilidad del embrión se determina por la velocidad y el tiempo de congelación, siendo más eficiente la sobrevivencia embrionaria post descongelamiento cuando se emplea etilenglicol, respecto al glicerol o dimetilsulfósido (Gibbons & Cueto, 2013).

La supervivencia de los embriones va a depender de su calidad y el estadio de desarrollo, los daños en estos pueden producirse en cualquier parte del proceso de congelación. Durante el equilibrio con la sustancia crioprotectora, los daños tóxicos y osmóticos son los principales.

Existen 3 mecanismos que pueden dañar a los embriones: el enfriamiento de 20 a -5 °C que provoca cambios en los lípidos, los microfilamentos y los microtúbulos; el paso de -5 a -35°C que causa la formación de cristales de hielo y por último el paso de -35 a -130°C puede producir daño a nivel estructural en el embrión y la zona pelúcida (Bezerra, 2002). Para el autor Romão et al. (2016), menciona que en las células embrionarias de diferentes especies con un alto contenido de lípidos, como en las ovejas, estas gotas de lípidos se unen al citoesqueleto, la membrana, los orgánulos y otras estructuras del citoplasma al sufrir el paso de enfriamiento de 15 a -5 °C se produce un daño irreversible y mortal.

2.5.1. Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias permeables o no permeables, desempeñan el papel de disminuir los cambios y daños de los embriones durante la congelación minimizando la formación de cristales de hielo. Pero los efectos negativos de estas sustancias están vinculadas a daños osmóticos y tóxicos que dependen principalmente por la concentración y el tiempo de exposición (Romão et al., 2016). Para Liebermann et al. (2002), hay que alcanzar un equilibrio entre la maximización de la velocidad de congelamiento y la minimización de la concentración del crioprotector para disminuir la toxicidad de los crioprotectores. Entre estos, tenemos la acetamida, el glicerol, rafinosa, dimetilsulfóxido (DMSO) y el etilenglicol (EG).

El etilenglicol es un crioprotector permeable de elección, por su alta capacidad de penetración, su baja toxicidad, por la protección hacia las membranas y las estructuras

citoplasmáticas (Cocero et al., 2002).

2.5.2. Técnicas de congelamiento

Los embriones se colocan en dosis descendientes de etilenglicol (0,5 M, 1 M, 1,5 M) en PBS a 20 – 25 °C, luego se almacenan en pajuelas de 0,25 cc. El tiempo entre colecta y congelamiento no debe sobrepasar los 40 minutos. El declive de temperatura se realiza a razón de 1°C a 3 °C hasta los -7°C durante 10 minutos produciéndose un descenso térmico de -35°C durante 15 minutos y finalmente las pajuelas se transfieren a un termo de N₂ a -196°C (Gibbons & Cueto, 2013).

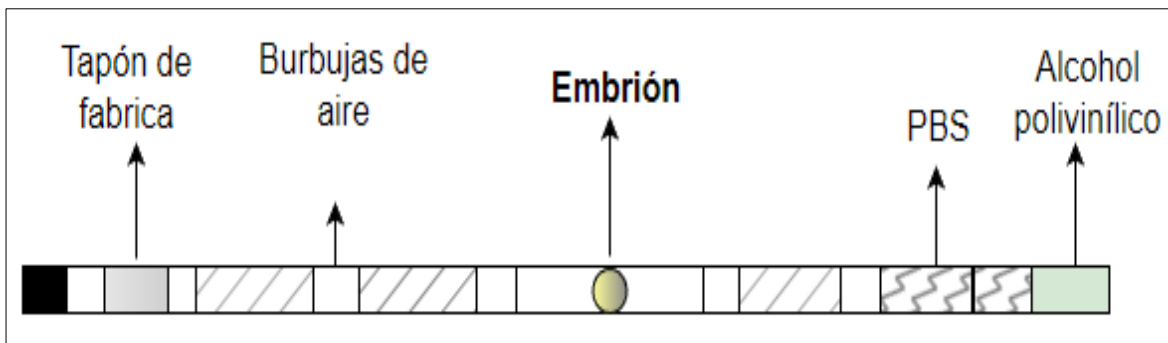


Figura 8. Disposición del embrión en la pajuela. Adaptado de Mucci et al., (2010).

Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales de campo

| | |
|------------------|----------------------------|
| Jeringas | Cooler |
| Guantes de látex | Tijeras |
| Termómetro | Máquina de esquilar |
| Ecógrafo | Collares de identificación |

3.1.2. Materiales físicos

| | |
|------------------------------|----------------------------|
| Sutura vicryl | Camilla pivotante |
| Equipo de cirugía | Escalímetro |
| Esponjas artesanales | Cauterizador |
| Jeringas 1, 2, 5, 10 y 20 ml | Collares de identificación |

3.1.3. Materiales químicos

| | |
|---|--|
| Alcohol antiséptico 70 % | Solución buffer a base de fosfatos (PBS) |
| Yodo | Xilacina 2 % (Dormi-Xyl [®] 2; Agrovvetmarket, Animal Health, Lima, Perú) |
| Lidocaína 2 % (Lavetec, Quito, Ecuador) | Ketamina 5 % (Ket-A-100 [®] ; Agrovvetmarket, Animal Health, Lima, Perú) |
| Nitrógeno líquido (NL ₂) | Flunixin meglumine (Flunimine [®] ; Agrovvetmarket, Animal Health, Lima, Perú) |
| Bloque mineral (Foscablock; Agro mixtos Cia.Ltda, Quito, Ecuador) | Penicilina 50 ml (Pen Duo Strep [®] 250/200; Agrovvetmarket, Animal Health, Lima, Perú) |
| Gel lubricante | Fenbendazol (Fendek; Farbiopharma, Quito, Ecuador) |
| Lactato de ringer | Concentrado saco de 40 kg (balanceado BIOmentos; Bioalimentar Cía. Ltda. Ecuador) |

3.1.4. Materiales reactivos

| | |
|---|---|
| Cloruro de sodio 0.9 % | Acetato de medroxiprogesterona (Novul [®] ; Afford, Argentina). |
| Prostaglandina F2 alfa (Sincrocio [®] ; Ourofino, Brasil). | Hormona folículo estimulante FSH (Folltropin [®] ; Vetoquinol, Georges, Ivaltrie, QC, Canadá). |
| Heparina sódica (Sanderson SA, Chile) | |

3.1.5. Materiales biológicos

| | |
|---|--|
| Diez ovejas de raza corriedale y katahdin | Dos reproductores ovinos: uno de raza dorper y uno de raza katahdin. |
|---|--|

3.1.6. Materiales de laboratorio

| | |
|-----------------------|---------------------------------|
| Sondas Foley (8G) | Filtros de colección |
| Micropipeteador | Estereoscopio |
| Tubos Falcón de 20 ml | Cajas cuadrículadas de búsqueda |
| Cajas Petri | Etilenglicol 10 % |
| Pinzas | Pajuelas de 0,25ml |

3.2. Metodología

3.2.1. Ubicación del proyecto

El presente trabajo se realizó en la granja de Nero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, ubicada en la provincia del Azuay, en la parroquia Baños, a 12 kilómetros del cantón Cuenca, sector Nero cuyas coordenadas son latitud sur 2°57'24"S y longitud oeste 79°6'22"O, una altitud de 3.100 metros de altura sobre el nivel del mar (m. s. n. m.) y una temperatura promedio de 10 °C.

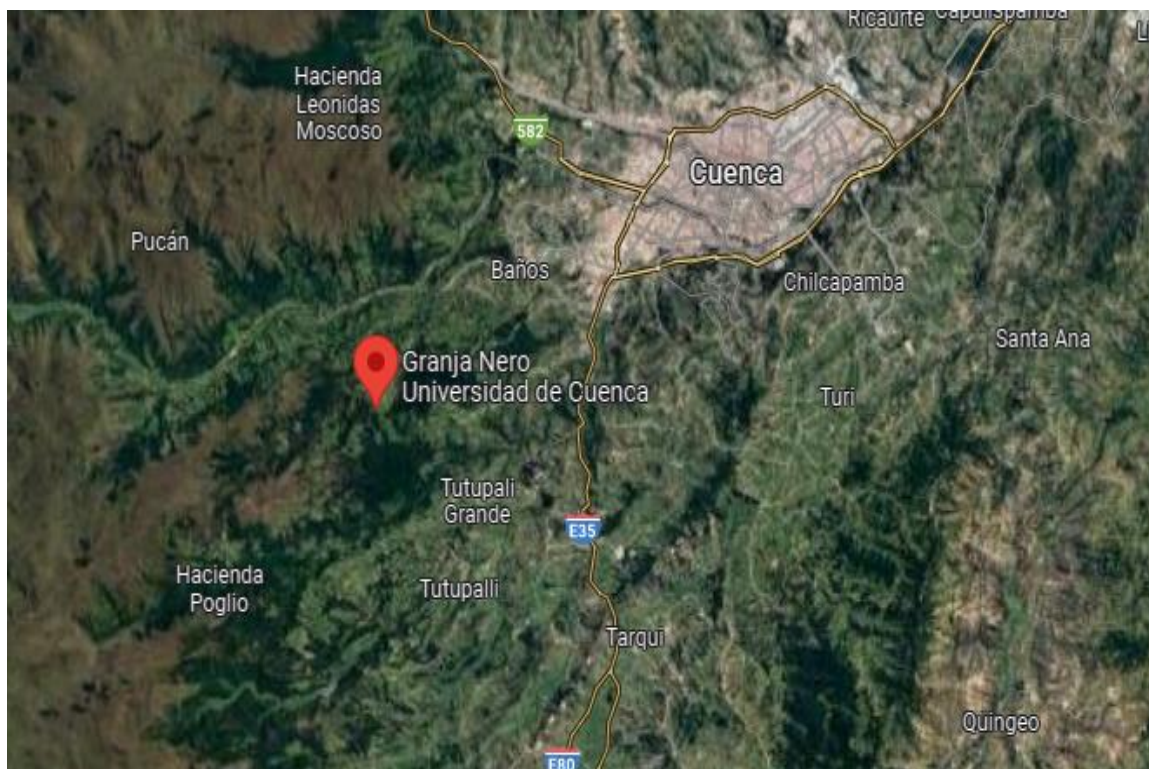


Figura 9. Ubicación del área de estudio (Cuenca-Azuay).




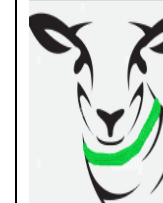





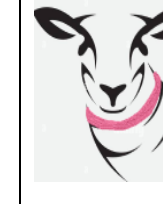
Fuente: (Google Maps,2022).

3.2.2. Selección de las ovejas y carneros

Se trabajó con 10 ovejas (8 de raza corriedale y 2 de raza katahdin destinadas para la superovulación), las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a las características fenotípicas (cuerpo simétrico, firmes con una buena conformación muscular, con un buen peso y tamaño respectivamente de acuerdo a cada raza), se recopiló información del historial productivo, reproductivo y origen que cumplieron con los siguientes parámetros de selección: una condición corporal de $3 \pm 0,5$ valorados sobre una escala de 0 a 5 en la que 0 es caquéctica y 5 es obesa (Russel , Doney, & Gunn , 1969), una edad de $3,5 \pm 1$ años, un peso promedio superior a 60 ± 10 kg, clínicamente sanas y adaptadas a un mismo protocolo de manejo,

alimentación y sanidad (desparasitación, vitaminización, recorte de cascos y disponibilidad de una mezcla de forrajes como el rygrass, kikuyo y trébol) que se aplica en la granja de Nero. De la misma manera, se seleccionó a 2 ovinos machos para ejecutar la monta directa. Asimismo, se realizó una evaluación física general con los siguientes parámetros: una condición corporal de 4, un examen clínico del órgano sexual del macho, una edad de 2 años y un peso promedio superior de 70 kg. Las ovejas fueron divididas aleatoriamente en 5 grupos, cada uno de ellos con 2 animales y se identificó a cada una con una cinta de colores.

Tabla 2: Disposición de los grupos de ovejas para el estudio realizado.

| | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 4 | Grupo 5 |
|--------------|--|--|--|---|--|
| N° ovejas |  |  |  |  |  |
| |  |  |  |  |  |

Fuente: Autores.

3.2.3. Protocolo de manejo y adaptación de los ovinos

Antes de iniciar el estudio tanto los ovinos machos y hembras fueron desparasitados con fenbendazol a una dosis de 5 mg/kg de peso (Fenbek; Farbiopharma, Quito, Ecuador). Asimismo, a todos los animales se les realizó un examen físico - clínico que incluyó la revisión de pezuñas, piel, dientes, etc., para descartar cualquier problema que dificulte la aplicación del protocolo. Previo al inicio y durante del protocolo de sincronización y superovulación, los ovinos estuvieron sometidos a un periodo de adaptación que incluyó un manejo nutricional con un alto nivel energético de 3,6 de Mcal (*flushing*) con alimento concentrado a una dosis 2 kg por cada animal, cuya formula nutricional se basa en una ración que contiene (proteína cruda min: 20%, grasa min: 2%, fibra cruda máx.: 7 %, cenizas máx.: 5%, humedad máx.: 12% y extractos libres de nitrógeno máx.: 54%). También se les suministró una mezcla de sales minerales *ad libitum* (9% de calcio, 2% de fosforo, 1,9% de azufre, 0,026% de magnesio y 46% de sal “Foscablock” (Agromixtos CIA. LTDA, Ecuador).

3.2.4. Tratamiento superovulatorio

El tratamiento hormonal que se utilizó para la sincronización de celo y superovulación de las hembras donantes se detalla a continuación.

Día 0: A las 6:30 a.m. se colocó una esponja intravaginal impregnada con 200 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Novul[®], Afford, Argentina).

Para la colocación de la esponja intravaginal se realizó la asepsia de la vulva, se introdujo una pinza quirúrgica con la esponja deslizándola suavemente en el canal vaginal, en un ángulo de 45°. Una vez ya en el interior se suelta la esponja, se saca la pinza suavemente, asegurando que la esponja esté introducida y sujeta fuertemente en el interior.

Día 1,2,3: Se observó que la esponja permaneciera en el interior de la vulva.

Día 4: A las 6:30 a.m. se removió la esponja inicial y se recambió por una nueva.

Día 8: A las 6:30 a.m. y 6:30 p.m., se aplicó 40 mg (2 ml) de FSH (Folltropin[®]) vía IM.

Día 9: A las 6:30 a.m. y p.m., se aplicó 30 mg (1,5 ml) de FSH (Folltropin[®]) vía IM.

Día 10: A las 6:30 a.m. y 6:30 p.m., se aplicó 20 mg (1 ml) de FSH (Folltropin[®]) vía IM. Asimismo, a las 6:30 a.m. se retiró la esponja intravaginal y se aplicó una dosis de 2 ml de prostaglandina (Sincrocio[®]) vía IM.

Día 11: A las 6:30 a.m. y 6:30 p.m., se aplicó 10 mg (0,5 cc) de FSH (Folltropin[®]) vía IM y también se observó signos del celo.

Día 12: Se ejecutó la monta directa cada 6 h (8h00, 12h00, 18h00) con el macho. Esto coincide a las 48 h del retiro de la esponja intravaginal.

Para el servicio se separó a las ovejas sincronizadas en un corral pequeño y se introdujo al macho al interior de este para que interactúe libremente con las hembras, estas presentaron signos del celo que se podían evidenciar con los cambios en su actitud, una vez que el macho cubría a una hembra se esperaba un tiempo promedio de 7 minutos (periodo refractario) para la siguiente monta de la otra hembra.

Día 18: Se realizó la colecta de las estructuras (embriones).

3.2.5. Recuperación de estructuras y evaluación de la respuesta ovulatoria

La recuperación de los embriones se realizó mediante laparotomía después de haber realizado la última monta directa (día 18 del protocolo). Las ovejas se mantuvieron en un

ayuno estricto de 24 horas de agua y comida para evitar punciones accidentales del rumen o la vejiga y evitar problemas digestivos como el desarrollo del timpanismo.

3.2.6. Protocolo preoperatorio.

Para la recuperación de las estructuras se procedió a limpiar el sitio de la incisión, se rasuró la zona abdominal y craneal de la ubre con la máquina esquiladora, luego con abundante agua y jabón yodado se lavó varias veces hasta desinfectar toda el área.

Se aplicó un tratamiento preanestésico con xilacina al 2 % (Dormi-Xyl[®] 2; Agrovvetmarket, Animal Health, Lima, Perú) a una dosis de 0,2 mg/kg por vía IM y ketamina al 5 % (Ket-A-100[®]; Agrovvetmarket, Animal Health, Lima, Perú) usando una dosis de 20 mg/kg por vía IM. En el área de incisión se colocó anestesia local con lidocaína al 2 % (Lavetec, Quito, Ecuador).

3.2.7. Recuperación de embriones

Se colocó a la oveja en una camilla pivotante con un sistema que inmovilizó a la hembra en decúbito dorsal, se inclinó hasta un ángulo de 40° a 45° de forma que las vísceras se desplacen en sentido craneal para tener una mejor visualización y exteriorizar sin problemas los cuernos uterinos. Se realizó antisepsia con jabón yodado, alcohol y desinfección del campo operatorio.

Se procedió a realizar una incisión sobre a línea alba de 8 a 10 cm y a unos 3 cm por delante de la ubre, y una vez en la cavidad abdominal se exteriorizó los cuernos uterinos y los ovarios. Se valoró la respuesta ovulatoria a través del registro del número y tamaño de cuerpos lúteos existentes en cada ovario. Además, se registró otras estructuras presentes en el ovario (folículos que no han ovulado). Se puncionó en la base del cuerpo uterino posterior a la bifurcación de cada cuerno, se insertó una sonda Foley (calibre 8G), se fijó insuflando el globo de la sonda con una jeringa de 5 ml. Al otro extremo del cuerno a nivel del oviducto se introdujo una aguja de 20 x 1 / 2 sin bisel dentro del canal oviductal y se administró 40 ml que contenía la solución de lavado Hepes- fluido oviductal sintético (hSOF suplementado con suero fetal bovino) a 37°C. A través del extremo de la sonda Foley se recuperó el líquido de lavado mediante un Flusing (flujo) retrogrado. El líquido recuperado fue contenido previamente en un filtro para retener las estructuras. Este procedimiento fue desarrollado de manera similar en el otro cuerno uterino. El filtro con el medio obtenido fue transportado a otro sitio donde se realizó la búsqueda de los embriones mediante el uso del estereomicroscopio. Estos procedimientos de transporte, manipulación y búsqueda fueron realizados a 37 °C.

Después de haber terminado la recolección se procedió a suturar las diferentes capas de tejido abdominal utilizando un hilo de sutura absorbible (vicril N°2) y posteriormente la piel con seda N°1 de un punto simple en cada lugar de la punción y se aplicó antibiótico de amplio espectro y larga acción (Penicilina G procaínica, Pen Duo Strep® 250/200) con una dosis de 12.000 UI/kg y un antiinflamatorio (Flunixin meglumine Flunimine®; Agrovvetmarket, Animal Health, Lima, Perú) con una dosis de 1,1 mg/kg vía IM. A las ovejas con respuesta superovulatoria se les aplicó una dosis de PGF_{2α} (Sincrocio®; Ourofino, Brasil), a una dosis de 25mg.

3.2.8. Clasificación de embriones

Una vez realizado el lavado de ambos cuernos uterinos, el sobrante obtenido el filtro fue vaciado en una caja Petri cuadrículada a resguardo de la luz y a temperatura de 37 °C, a través del uso del estereomicroscopio (Nikon S2 Tokio, Japón), una vez recuperados todas las estructuras fueron clasificadas de acuerdo con los criterios morfológicos “grado de desarrollo y calidad” establecido por la International Embryo Transfer Society (IETS).

Luego de la clasificación se procedió a realizar la criopreservación de los embriones en el estadio de desarrollo de mórulas y blastocisto con una calidad excelente y regular.

3.2.9. Congelación de embriones

Una vez recuperados y seleccionados los embriones se colocaron en una solución de etilenglicol (EG; Ethylene Glycol Freeze Plus, VIGRO™, Vetoquinol, Canadá), fueron cargados individualmente en una pajuela plástica de 0,25 ml y sometidos a un proceso de enfriamiento lento y congelación para lo cual se utilizó una máquina congeladora programable (cryologic, FREEZE CONTROL®, Australia).

Para realizar la congelación, La máquina se programó a una tasa de 0,3 a 0,5 °C/min hasta los -7 °C, cuando alcanzó esta temperatura se tocó la pajuela con un elemento metálico enfriado N₂ (inducción de la cristalización o seeding). Una vez que se hayan cristalizado todas las pajuelas por completo, se realizó un descenso térmico a 0,5 °C/min hasta -35°C (enfriamiento lento). Una vez alcanzado la temperatura de -35°C, se retiró la pajuela de la máquina congeladora y se procedió a sumergirlas en un contenedor con N₂ (enfriamiento rápido), finalmente las pajuelas fueron almacenadas en un termo de N₂.

3.3. Análisis de los resultados

Los datos fueron recopilados en hojas respectivas y posteriormente tabulados en Microsoft Excel, software que se utilizó para la depuración de todos los datos, para después ser analizados mediante el programa estadístico SPSS® versión 22 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU): se realizó una estadística descriptiva de todas las variables, se usó tablas de frecuencia e histogramas para valorar la respuesta superovularia a través del número de estructuras obtenidas. La asociación entre el tamaño del cuerpo lúteo y la calidad de las estructuras obtenidas fueron valoradas a través de una correlación de Spearman.

Resultados

El número de ovejas que respondieron al tratamiento de superovulación fue del 50 % (5/10), de estas 5 hembras se recolectaron un total de 42 estructuras de las cuales el 72 % (31/42) fueron de excelente calidad distribuidas en 77,4 % (24/31) mórulas y el 22,6 % (7/31) blastocistos. Al valorar la respuesta superovulatoria de todas las ovejas que respondieron al tratamiento a través de la visualización de las estructuras se contabilizaron un total de 71 ± 1 cuerpo lúteo y 9 ± 1 folículos. Asimismo, se valoró el diámetro del cuerpo lúteo $9,91 \pm 2,04$ mm, el cual se correlacionó de manera positiva y significativa con la calidad de las estructuras obtenidas ($r=0,413$, $p=0,0001$).

Tabla 3. Descripción de la respuesta ovulatoria en ovejas corriedale y katahdin sometidas a un solo tratamiento de superovulación con 200 mg FSH.

| N° animal | Cuerpo lúteo (CL) | | | | Folículo (F) | | | |
|-----------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|--------------|--------------------|--------------------|------------------|
| | Total CL | Diámetro min. (mm) | Diámetro máx. (mm) | $\bar{X} \pm DE$ | Total F | Diámetro min. (mm) | Diámetro máx. (mm) | $\bar{X} \pm DE$ |
| 280 | 11 | 7 | 12 | $9,54 \pm 1,86$ | - | - | - | - |
| 275 | 2 | 11 | 11 | 11 ± 0 | 3 | 4 | 4 | 4 ± 1 |
| 256 | 34 | 4 | 15 | $9,61 \pm 2,57$ | 2 | 4 | 4 | 4 ± 1 |
| 001 | 10 | 8 | 11 | $10,1 \pm 1,13$ | - | - | - | - |
| 002 | 14 | 9 | 12 | $10,64 \pm 0,92$ | 4 | 3 | 4 | $3,75 \pm 0,5$ |
| Total | 71 | 4 | 15 | $9,91 \pm 2,04$ | 9 | 3 | 4 | $3,88 \pm 0,33$ |

Tabla 4. Embriones recuperados en el lavado uterino de ovejas corriedale y katahdin sometidas a un solo tratamiento de superovulación con 200 mg FSH.

| Estado de desarrollo | | | | |
|-----------------------------|---------------|--------------------|-------------|--------------|
| Calidad | Mórula | Blastocisto | UFOs | Total |
| Excelente | 24 | 7 | - | - |
| Regular | 6 | - | - | - |
| Malo | 1 | - | - | - |
| Degenerado | - | - | 4 | - |
| TOTAL | 31 | 7 | 4 | 42 |

Discusión

El 100 % de las ovejas a las que se les aplicó el protocolo de superovulación presentaron estro, pero el porcentaje de respuesta a la superovulación a través de la visualización de cuerpos lúteos fue del 50 % (5/10). Los resultados de este estudio de las donadoras, es similar al encontrado por (Martínez - Rojero et al., 2017) en ovinos criollos y por (Urbán-Duarte et al., 2016) en ovejas de la raza chiapas, no obstante la tasa de respuesta superovulatoria de las ovejas de nuestra tesis fue menor al reportado en otros estudios en los que se obtienen tasas de hasta un 70 % de respuesta al tratamiento con FSH (Aké-López et al., 2003), quizás el alto porcentaje de respuesta de este estudio se deba a la utilización de ovejas de raza pelibuey en la que se conoce que presentan una mayor respuesta a la aplicación de un tratamiento superovulatorio. Sin embargo, algunos investigadores concluyen que siempre existirá un porcentaje de hembras que no respondan al tratamiento hormonal superovulatorio aplicado (Bruno - Galarraga et al., 2014; Cognie, 1999). La respuesta superovulatoria observada en nuestro estudio fue: CL (71 ± 1), folículos que no llegaron a ovular (9 ± 1) y número de embriones congelables (37 ± 1), lo que nos permite dilucidar que existió una variabilidad entre las hembras que respondieron al tratamiento, lo que concuerda con otras investigaciones que sugieren que al aplicar un tratamiento de superovulación no se tendrá un resultado homogéneo y que mucho de esta heterogeneidad dependerá de algunos factores genéticos, nutricionales, de manejo, medioambientales y otros (Martínez-Rojero et al., 2017). No obstante, se puede afirmar que la respuesta de superovulación dependerá en gran medida al factor intrínseco de cada hembra. Según, Martínez Rojero et al. (2017) la variabilidad individual a la respuesta hormonal en la oveja está condicionada por el estado fisiológico del ovario y por el número de pequeños folículos (1 a 2 mm) en el momento de comenzar el tratamiento hormonal con FSH, en caso de nuestro estudio desconocíamos la cantidad de folículos en el ovario y el tamaño de estos al momento de iniciar con el tratamiento hormonal de superovulación.

No obstante, en otros estudios en los que se ha realizado ecografía ovárica (Martínez-Rojero et al., 2017) se ha podido evidenciar el efecto negativo que tiene la presencia de folículos mayores a 6 mm de diámetro y la posible ventaja que tiene la presencia de folículos entre un rango de 2 a 3 mm; lo que permite hipotetizar que la alta variabilidad individual al tratamiento superovulatorio se encuentra correlacionada positivamente ($r = 0,7$; $p < 0,05$) con el número de folículos menores a 3 mm presentes al momento de iniciar el tratamiento (Bruno-Galarraga et al., 2014; González-Bulnes et al., 2004; Menchaca et al., 2010).

Como se indicó con anterioridad, el genotipo de la hembra es otro de los factores que puede estar relacionado directamente con la heterogeneidad de la respuesta al tratamiento superovulatorio y por ende con su eficiencia, por cuanto se ha demostrado que las razas hiperprolíficas (merino booroola, belclare, cambridge, aragonesa, lacaune, frisona milchschaft, finnish landrace, iverdale, romney marsh) tienen una mejor respuesta al tratamiento superovulatorio y por consiguiente con el número de embriones congelables o transferibles y el número de crías nacidas (Hanrahan et al., 2004; Jurado et al., 2012; Palomera et al., 2014). Las razas que fueron utilizadas en nuestro estudio eran mestizas (corriedale y katahdin) cuyas características reproductivas son, tener un solo parto al año, lo que se relaciona con una prolificidad disminuida, lo que pudo estar relacionado con la baja tasa de respuesta en el bajo número de cuerpos lúteos y embriones colectados.

Navarrete-Sierra et al., (2008) en su estudio realizado en ovejas pelibuey obtuvieron la cantidad de 89 cuerpos lúteos, siendo este valor superior al encontrado en nuestro estudio, pero un resultado similar de 35 embriones viables.

Conclusiones

La aplicación de un protocolo de superovulación basado en el uso de FSH a una dosis total de 200 mg, logro un porcentaje moderado de superovulación (50%), valorada a través del número de embriones recolectados lo que demuestra una alta variabilidad individual de las hembras utilizadas en nuestro estudio.

Se obtuvo un total de 42 embriones de los cuales solo 37 fueron seleccionados como aptos para ser congelados y almacenados en N₂, creando así el primer banco de material genético disponible para el mejoramiento genético del hato ovino existente en la granja experimental de Nero de la Universidad de Cuenca.

Existió una correlación entre las dos variables tamaño de cuerpo lúteo y calidad de estructuras obtenidas (embriones).

Referencias

- Abecia, J. A., Forcada, F., & González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3–4), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>
- Abecia, A., & Forcada Miranda, F. (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino (Vol. Primera). Zaragoza: Servet.
- Aisen, E. G. (2004). *Reproducción Ovina Y Caprina*. Inter-médica. <https://ppryc.files.wordpress.com/2017/04/reproduccion3b3n-ovina-y-caprina.pdf>
- Aké-López, J. R., Heredia y Aguilar, M., Alfaro-Gamboa, M., Centurión-Castro, F., & Rojas-Rodríguez, O. (2003). Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de ovejas Pelibuey. *Veterinaria México*, 34(3), 225–234. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42334301>
- Alotaibi, M. ., Alhimaidi, A. R., Al-Ghadi, M. Q., Ammari, A. A., & Al-Malahi, N. M. (2022). Evaluation of the Maturity and Gene Expression of Sheep Oocytes and Embryos Cultured in Media Supplemented with. *Genes*, 13(10), 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/genes13101844>
- Arcaus, H., Juanena, D., & Perera, R. (2014). Respuesta embrionaria a la superovulación con altas o bajas concentraciones de progesterona en ovejas merino. Montevideo: Universidad de la República. Obtenido de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10264/1/FV-31097.pdf>
- Azevedo, J. M., Valentim, R. C., & Correia, T. M. (2006). Control hormonal de la actividad ovárica en ovinos. *Albeitar*, 98, 1–4. https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/5801/3/Albeitar_98_%28Setembro_06%29_Espanhol.pdf
- Balcázar-Sánchez, J. A., & Porras-Almeraya, A. (2009). *Manual de prácticas en manejo reproductivo de ovinos y caprinos*. <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, 10(3), 344–348.
- Bruno-Galarraga, M. M., Cueto, M., Gibbons, A. E., Pereyra-Bonnet, F., Catalano, R., & Gonzalez-Bulnes, A. (2014). Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Ruminant Research*, 120(1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.04.002>
- Chile, F. (2008). *Manual de producción ovina*. <https://www.indap.gob.cl/docs/default-source/default-document-library/manual-de-producción-ovina-para-extensionistas.pdf?sfvrsn=0>
- Cognie, Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1), 105–116. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00235-0)
- Córdova Izquierdo, A., Córdova Jiménez, M. S., Córdova Jiménez, C. A., & Guerra Liera, J. E. (2008). Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Revista Veterinaria*, 19(1), 67–79. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/20-Cordova-Procedimientos.pdf
- Correa, E. N. (2021). *Efecto de la superovulación sobre la cinética folicular en ovejas de raza*

- katahdin* y *criollas* de Ecuador.
https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32258/1/Tesis_176_Medicina_Veterinaria_y_Zootecnia_-CD_682_Correa_Salgado_Esteban_Nicolás.pdf
- Cueto, M., Gibbons, A., Juan, G., Arrigo, J., & Wolff, M. (2016). Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. In *Inta* (2nd ed.). https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-manual_de_semen_ovino_2da_edicion.pdf
- Dickson, L., Reverón, Á., Baldizán, A., & García, O. (2017). Manual de producción de caprinos y ovinos. In *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. (Vol. 3). Alfredo Maneiro.
- D'Alessandro, A. G., Martemucci, G., & Taibi, L. (2005). How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Elsevier*, 63, 1764 - 1774. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.002>.
- Elvira, L., Hernandez, F., Cuesta, P., Cano, S., Gonzalez, M., & Astiz, S. (2012). Accurate mathematical models to describe the lactation curve of Lacaune dairy sheep under intensive management. *The Animal Consortium*, 7(6), 1044–1052. <https://doi.org/10.1017/S175173111200239X>
- FAO. (2013). Current status and options for livestock biotechnologies in developing countries. *Biotechnologies for Agricultural Development*, 123–190. <https://www.fao.org/3/i2300e/i2300e03.pdf>
- Galarza, A. (2020). *Implementación de un programa de biotecnologías reproductivas en la Carrera de Medicina Veterinaria*.
- García Guillermo. (2000). Como debe ser el corriedale. *Producción Animal*, 1–3. www.produccion-animal.com.ar
- Gibbons, A., & Cueto, M. (2012). Manual De Inseminación Artificial En La Especie Ovina. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Agropecuaria Bariloche Centro Regional Patagonia Norte*, 1–19. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/07-manual_ia.pdf
- Gibbons, A., & Cueto, M. (2013). Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos. In *Inta* (2nd ed.). https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/28-MANUAL.pdf
- González Rosales, M. G., & Quezada Moscoso, S. M. (2016). *Administración de progesterona de acción prolongada después de la fertilización en ovinos superovulados, y su relación con el tamaño de cuerpos lúteos y embriones* [Universidad de Cuenca]. http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26018/1/TESIS_pdf.pdf
- González-Bulnes, A., Baird, D., Campbell, B. K., Cocero, M. J., García, R. M., Inskeep, E. K., & Veiga, A. (2004). Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 421–435. <https://doi.org/10.1071/RD04033>
- Gordón, M. B. (2017). *Comparación de dos protocolos de superovulación utilizando diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) en la producción de embriones ovinos*. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9088/1/T-UCE-0014-001-2017.pdf>
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway,

- S. M. (2004). Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70(4), 900–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Harasymowycz, J., Benítez, M., Morales, C., Paul, A., & Checo, F. (2014). Respuesta ovárica a tratamientos superovulatorios con dosis constantes y decrecientes de FSH evaluada por laparoscopia en ovejas crucea texel. *Compend. Cienc. Vet.*, 04(01), 19–23. <http://scielo.iics.una.py/pdf/ccv/v4n1/v4n1a04.pdf>
- IICA. (2015). *Manual de Buenas Prácticas en Ovinos* (p. 56). <http://repiica.iica.int/docs/B3975e/B3975e.pdf>
- INEC. (2020). *Instituto Nacional de Encuestas y Censos*. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC). <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-produccion-agropecuaria-continua/>
- Jurado, J. J., Calvo, J. H., & Muñoz Flores, R. (2012). Variantes génicas de alta prolificidad en el ovino. *Portal Veterinaria Albéitar*, 28, 4–7. <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/11375/ARTÍCULOS-RUMIANTES/variantes-génicas-alta-prolificidad-ovino.html>
- Lincoln, G. A. (1992). Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. *Animal Reproduction Science*, 28(1–4), 203–217. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90107-0](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90107-0)
- Liebermann, J., Nawroth, F., Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G., Tucker, M. J., & Specialists, G. R. (2002). Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. *Biology of Reproduction*, 1680(October), 1671–1680. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.006833>
- Lozano González, J. F., Uribe Velásquez, L. F., & Osorio, J. H. (2012). Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 6(2), 134–147.
- Lucio, R., Sesento, L., Bedolla, J., & Cruz, A. (2018). Parámetros genéticos para pie de cría en ovinos de la raza katahdin Genetic parameters for breeding stock in sheep of katahdin race. *Artículo Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias Septiembre*, 5(16), 1–5. www.ecorfan.org/bolivia
- Maciel, G. S., Rodriguez, M. G. K., Da Silva, P. D. A., Nociti, R. P., Uscategui, R. A. R., Santos, V. J. C., Feliciano, M. A. R., Vicente, W. R. R., & Oliveira, M. E. F. (2017). Ovarian Superstimulation Treatment for Multiple Ovulation and Embryo Transfer Programs in Sheep. *Investigação*, 16(8), 30–36. <https://doi.org/10.26843/investigacao.v16i8.1888>
- Marizancén Silva, M. A., & Artunduaga Pimentel, L. (2017). Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2), 247–259. <https://doi.org/10.22490/21456453.2050>
- Martínez-Rojero, R., Villanueva-Mejía, O., Quintero-Zarco, L., & Reyna-Santamaría, L. (2017). Evaluación de un protocolo de superovulación para transferencia de embriones en ovejas Criollas de la Montaña de Guerrero. *Abanico Veterinario*, 7(3), 30–36. <https://doi.org/10.21929/abavet2017.73.3>
- Menchaca, A., Vilario, M., Crispo, M., De Castro, T., & Rubianes, E. (2010). New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1), 113–118. <https://doi.org/10.1071/RD09222>

- Molina, S., Gamarra, P., Ticona, C., Huayta, M., Rojas, G., Harold, U., Guerra, P., & Cruz, D. J. (2020). Evaluación de un protocolo de sincronización de estro en ovejas con destete temporal para inseminación artificial a tiempo fijo Evaluation of an oestrus synchronization protocol in sheep with temporary weaning for artificial insemination at fixed time. *Rev Inv Vet Perú*, 31(3), 1–6. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.16820>
- Morales Gordón, M. B. (2016). Comparación de dos protocolos de superovulación utilizando diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) en la producción de embriones ovinos [Universidad Central del Ecuador]. In *Universidad Central del Ecuador*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00563>
- Mucci, N., Aller, J., Cabodevilla, J., Kaiser, G., Hozbor, F., & Albeiro, R. (2010). Criopreservación de embriones bovinos. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 7(1), 1.11. https://www.produccion.animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embrionario/14-criopreservacion.pdf
- Mujica, F. (2005). Razas ovinas y caprinas en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias. In *Ministerio de Agricultura Instituto de Investigaciones Agropecuarias* (2005th ed.). <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/7027>
- Navarrete-Sierra, L., Cruz-Tamayo, A., González-Parra, E., Piña-Aguilar, R., Sangines-García, J., Toledo-López, V., & Ramón-Ugalde, J. (2008). Efecto de la aplicación de la hormona de crecimiento recombinante (rbST) sobre la respuesta superovulatoria y la viabilidad embrionaria en ovejas de pelo. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, 18, 175–179. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-22592008000200009&script=sci_arttext
- Ortega, D. A. (2020). Enfoque de la Biotecnología Industrial en Ecuador y la Provincia de Esmeraldas. *Polo Del Conocimiento*, 5(08), 1228–1239. <https://doi.org/10.23857/pc.v5i8.1655>
- Palomera, C. L., Alejandro, R., & Morales, A. (2014). Genes con efecto mayor sobre la fertilidad de ovejas. Revisión Genes with major effect on fertility in sheep. Review. *REVISIÓN Rev Mex Cienc Pecu*, 5(1), 107–130.
- Pazmiño, F., & Rubio, D. (2012). *Diagnóstico de producción y comercialización de carne ovina en los principales centros de distribución de las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo*. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7210/1/27T0369.pdf>
- Penna, C., Borges, I., Cavalcanti, L., & Cerqueira, M. (2014). Guía práctica de producción ovina en pequeña escala en iberoamérica. In *Heritage* (pp. 1–220). https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-produccionovina_inta.pdf
- Rubianes, E., & Ungerfeld, R. (2002). Perspectivas de la investigación sobre reproducción ovina en América Latina en el marco de las actuales tendencias productivas. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 10(2), 117–125.
- Sanchez Muñoz, J. B., Mejía Villanueva, O., & Manzur Cruz, A. (2014). Programa de transferencia de tecnología en aplicación de técnicas asistidas para ovinos en el trópico. In *Manual de tranferencia de embriones en ovinos* (Vol. 58, p. 41).
- Scaramuzzi, R., Adams, R., Baird, T., Campbell, K., Downing, A., Findlay, K., Henderson, M., Martin, B., Mcnatty, M., & Tsonis, G. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Pubmed*, 5, 459–478.

<https://doi.org/10.1071/rd9930459>

- Stringfellow, D., & Givens, M. (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)*. Champaign, IL.
- Simonetti, L. (2008). Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale [Universidad Politécnica de Valencia]. In *Riunet*. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/3784/tesisUPV2912.pdf>
- Urbán-Duarte, D., Méndez-Gómez, A., Alvarez-Gallardo, H., Pérez-Reynoso, S., Gordillo-Paéz, L., Pedroza-Villagómez, J., & De la Torre-Sánchez, J. (2016). V Congreso Nacional sobre Conservación y Utilización de los Recursos Zoogenéticos. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 3(Suplemento 2), 119–122. <https://rmae.voaxaca.tecnm.mx/>
- Valdez, D. (2013). *Efecto del dodecil sulfato ionico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/500/1/Tesis.pdf>
- Verdoljak, J. (2017). Ovinos de pelo o deslanados. *Producción Animal*, 2–3. www.produccion-animal.com.ar
- Wang, D., Yang, Y., Song, Y., Fu, S., He, X., Wang, B., Wang, L., Chen, X., Li, X., Liu, Y., & Cao, G. (2022). The Effect of Ghrelin on the Maturation of Sheep Oocytes and Early Embryonic Development In Vitro. *Animals*, 12(9), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani12091158>

Anexos

Anexo A. Plantilla de valoración de donantes

| Datos generales | | Anamnesis | | Historial clínico | | Revisión clínica | |
|--------------------|--|--------------------------------------|--|------------------------------|--|--------------------|--|
| ID donante: | | Fecha de ultimo suceso de exposición | | Ultima enfermedad presentada | | Condición corporal | |
| Raza | | N° partos | | Fecha ultimo tratamiento | | | |
| Edad | | Fecha del último parto | | Fármacos aplicados | | | |
| Peso | | | | | | | |

Anexo B. Registro del protocolo de las ovejas donadoras

| ID oveja donadora: | | | | |
|--------------------|-----------|-------|---|-----------------------|
| | Día | Fecha | Mañana (6:30) AM | Tarde (18:30) PM |
| 0 | martes | | Colocar esponja | |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | sábado | | Recambio de esponja | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |
| 7 | | | | |
| 8 | miércoles | | FSH (40 mg = 2 ml) | FSH (40 mg = 2 ml) |
| 9 | jueves | | FSH (30 mg = 1.5 ml) | FSH (30 mg = 1.5 ml) |
| 10 | viernes | | FSH (20 mg = 1 ml) + retirar esponja + PG (25 mg = 2ml) | FSH (20mg = 1 ml) |
| 11 | Sábado | | FSH (10mg = 0,5cc) | FSH (10mg = 0,5cc) |
| 12 | Domingo | | Dar monta 8 am, 12pm, 6pm | Dar monta |
| 13 | | | | |
| 14 | | | | |
| 15 | | | | |
| 16 | Jueves | | | Retirar agua y comida |
| 17 | Viernes | | Retirar agua y comida | Retirar agua y comida |
| 18 | Sábado | | Lavado y colecta embriones | |

Anexo C. Registro de la monta donadoras

| CONTROL DE MONTA DONADORAS | | | | | |
|----------------------------|----------|----------|------|------|------|
| Fecha | ID oveja | Semental | 8 AM | 1 PM | 6 PM |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Anexo E. Registro de estructuras recuperadas mediante el lavado

| ID oveja | N° embriones | Estado de desarrollo | Calidad | Embriones transferibles |
|--------------------------|--------------|----------------------|---------|-------------------------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| Embriones totales | | | | |



Anexo F. Ovejas donadoras



Anexo G. Sementales



Anexo H. Identificación de ovejas donadoras



Anexo I. Realización de la monta



Anexo J. Preparación prequirúrgica



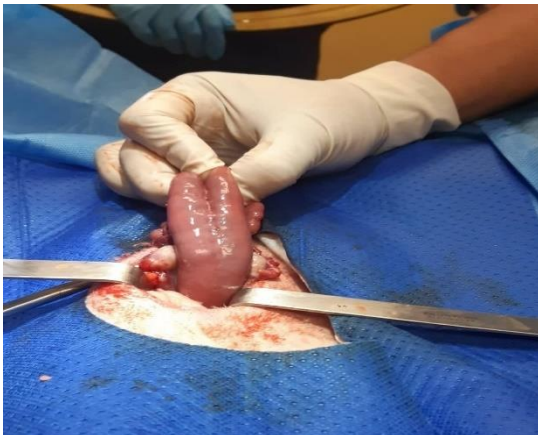
Anexo K. Colocación de la oveja en la camilla pivotante



Anexo L. Preparación del área de cirugía.



Anexo M. Incisión en la zona abdominal.



Anexo N. Exteriorización de los cuernos uterinos.



Anexo O. Respuesta superovulatoria



Anexo P. Colocación de la sonda Foley



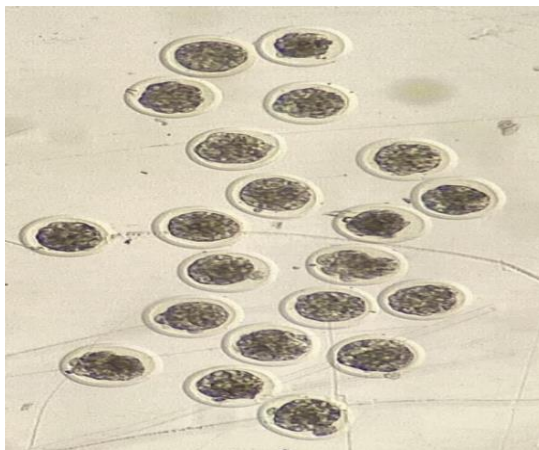
Anexo Q. Lavado



Anexo R. Recolección en filtro de colección.



Anexo S. Búsqueda de embriones



Anexo T. Embriones



Anexo U. Colocación en pajuelas



Anexo V. Congelación y almacenamiento de pajuelas en N₂