

**Universidad Nacional de Río Negro.
Sede Alto Valle-Valle Medio, Choele Choel, Río Negro.
Medicina Veterinaria.**



Informe Final para obtener el Título de Médica Veterinaria.

**“Biotecnologías reproductivas aplicadas en bovinos de
carne en la Patagonia”**

**Autora: Zabala Guadalupe Graciela.
Tutora: MV., Alicia Reumann.
Evaluadores: Thern Eduardo y Pitte Virginia
Año: 2023.**

Agradecimientos:

En primer lugar, agradezco a mi familia, en especial a mi madre y padre por haberme ayudado desde el comienzo de mi etapa universitaria.

A mi abuelo, por cada vuelta a casa para contarle cómo me estaba yendo en la carrera.

A mis hermanos y hermana, que siempre estuvieron con un mensaje de aliento.

A mi perra Nira que con su compañía hacía todo un poco más llevadero y lindo.

A las amistades, que no solo fueron amistades de estudio sino de vida.

A los veterinarios Ignacio Mujica, Hernan Alonso, Ivana Spiazzi y Gerardo Taubas, por darme el espacio de aprendizaje y la posibilidad de realizar este trabajo final, profesionales predispuestos a compartir sus saberes.

Al personal de la estancia Santa Teresita, lugar físico donde pude desarrollar las prácticas. A Luis Villegas, Mario Ovando, Cesar Sepúlveda, Florentino Melinao y Emanuel Troncoso, personas que hicieron que mi estadía se diera en un contexto de compañerismo colectivo.

A los docentes profesionales de la carrera de Medicina Veterinaria, por su predisposición y disponibilidad para transmitir conocimientos. En especial a Alicia, docente y tutora, persona muy dedicada, operativa y bondadosa.

A la universidad pública por ser templo de mi desarrollo y formación, gracias a ella pude estudiar lo que siempre quise.

Por último, pero no menos importante, a mí, por no rendirme en la búsqueda de lo que deseo, por siempre lograr lo que me propongo y luchar por conseguirlo.

Índice
Parte I:

Introducción	8
Objetivos del TFG	10

Parte II:

Generalidades de la Patagonia	11
Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina	14
Fisiología y endocrinología del aparato reproductor de la hembra bovina	16
Generalidades de la Inseminación Artificial (IA)	20
Generalidades de la Transferencia de Embriones (TE)	21
Inicio de protocolo	23
Protocolo para donantes	23
Protocolo para receptoras	25
Inseminación Artificial	27
Inicio de la Transferencia Embrionaria	30
Selección de Donantes	30
Selección de Receptoras	31
Colecta de embriones	34
Búsqueda y acondicionamiento de embriones	39
Clasificación embrionaria	42
Armado de pajuela embrionaria para transferencia en fresco	46
Transferencia embrionaria	48
Criopreservación	50
Criopreservación del semen bovino	50
Criopreservación del embrión bovino	56
Principio de la criopreservación embrionaria	56

Parte III:

Consideraciones finales	60
Referencias bibliográficas	64

Índice de imágenes

Imagen 1: Imagen satelital de estancia Santa Teresita	9
Imagen 2: Zonas Libres de Fiebre Aftosa reconocidas por OIE.	13
Imagen 3: Moco cervical cristalino.	20
Imagen 4: Monta entre hembras.	20
Imagen 5: Pajuela de 0,5 ml y 0,25 ml.	28
Imagen 6: Pajuelas descargada y llena.	28
Imagen 7: Termo de congelación.	28
Imagen 8: Descongelador con agua y termómetro.	29
Imagen 9: Vaina de plástico.	29
Imagen 10: Pistola de inseminación con su émbolo desplazado.	30
Imagen 11: Grupo de donantes en corral con cría al pie.	31
Imagen 12: Grupo de receptoras en corral.	34
Imagen 13: Estilete metálico y dilatador cervical.	36
Imagen 14: Sonda o catéter Foley y estilete metálico.	37
Imagen 15: Llenado del balón.	37
Imagen 16: Sistema cerrado de colección de embriones.	39
Imagen 17: Limpieza a presión del filtro.	40
Imagen 18: Placa de Petri, lupa y platina térmica.	40
Imagen 19: Pasaje de las estructuras.	41
Imagen 20: Lavado de embriones.	42
Imagen 21: 13 embriones estadio mórula y 1 blastocisto temprano. Calidad I.	44
Imagen 22: Mórulas, mórulas con blastómeras sueltas y blastocistos tempranos.	45
Imagen 23: Acople de pajuela en vaina.	47
Imagen 24: Pajuelas en platina térmica.	47
Imagen 25: Transferencia embrionaria.	49
Imagen 26: Pajuelas amarillas cargadas.	58
Imagen 27: Acople de pajuela con su indicador.	58
Imagen 28: Congelador programable con metanol.	59
Imagen 29: Pajuelas de TE sumergidas en metanol.	59
Imagen 30: Realización del <i>seeding</i> .	60
Imagen 31: Inicio de la formación de columna de hielo.	60

Índice de esquemas:

Esquema 1: Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina.	15
Esquema 2: Fases del ciclo estral bovino.	18
Esquema 3: Protocolo vaca y vaquillonas donantes.	25
Esquema 4: Protocolo de sincronización en las hembras receptoras.	27
Esquema 5: Clasificación de las técnicas de colecta embrionaria.	34
Esquema 6: Estadios de desarrollo embrionario.	44
Esquema 7: Llenado de pajueta.	46
Esquema 8: Técnicas de Transferencia Embrionaria.	48
Esquema 9: Clasificación de los crioprotectores.	57

Introducción

La región patagónica se encuentra al sur de la barrera zoofitosanitaria, límite establecido por el río Colorado y Barrancas, la cual impide el ingreso de animales en pie, esto hace alusión a que no puede haber movilización de bovinos de un área libre de Fiebre Aftosa (FA) con vacunación a un área sin vacunación, ya que comprometería la sanidad de los animales y el estatus sanitario de esta zona.

Este estatus sanitario debe ser confirmado anualmente por nuestro país. Se fundamenta la condición con los resultados de la vigilancia epidemiológica, la cual se lleva a cabo mediante la realización de muestreos serológicos, atención de notificaciones y sospechas. De esta manera se mantiene la condición sanitaria de libre de FA en las distintas zonas.

Esta situación representa una ventaja sanitaria para la región patagónica (en desmedro de impedir la mejora genética a través de animales en pie) y transforma a las biotecnologías de la reproducción en herramientas muy beneficiosas a tener en cuenta para apostar al avance genético del ganado bovino. Su utilización está dirigida a intensificar el mejoramiento y la multiplicación de razas e individuos de calidad genética superior que conlleve a un incremento de dicho avance (Uffo O., 2011).

Las biotecnologías de la reproducción son todas aquellas técnicas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales, tanto hembras como machos. Esta eficiencia según lo expuso Morales et al. (2009) (citado por Bustillo Parrado J. C. et al., 2020) se encuentra estrechamente ligada con otros factores como son nutrición, sanidad, raza, ambiente, tipo de producción y espacios que no atenten contra el bienestar (Jurado Roa N. D., 2020). Dichas técnicas son la inseminación artificial (IA), la transferencia embrionaria (TE), clonación, sexaje de embriones, entre otras.

El presente trabajo final de grado (TFG) se ha realizado a partir de una exhaustiva revisión bibliográfica sobre las biotecnologías reproductivas aplicadas en ganado bovino y las técnicas, procesos, conocimientos, habilidades y competencias aprendidas durante las prácticas realizadas en un establecimiento ubicado en Corcovado, Chubut.

El interés en realizar las prácticas en este establecimiento radica que el mismo cuenta con una muy buena genética en su rodeo, también la capacidad profesional y de infraestructura y equipamiento necesarios para poder llevar a cabo una excelente implementación de las biotecnologías reproductivas.

La estancia en cuestión se llama “Santa Teresita” (imagen 1, color azul) y presenta una extensión de 3500 hectáreas. La misma cuenta con 400 bovinos pedigree de raza Hereford y

un pequeño grupo de bovinos de rodeo general. La hacienda se encuentra categorizada de la siguiente manera:

- 120 vacas madres
- 5 toros padres
- 26 vaquillonas preñadas
- 55 vaquillonas de 1 año
- 27 vaquillonas de reposición de 2 años
- 34 toritos 1 año
- 133 terneros orejanos



Imagen 1: Imagen satelital de estancia Santa Teresita.

Fuente: Administrador Luis Villegas.

Las prácticas en la estancia tuvieron una duración de 17 días, en donde las actividades ejecutadas giraron en torno al inicio de un tratamiento hormonal en un total de 10 hembras de pedigree (6 vacas con cría al pie y 4 vaquillonas) utilizadas como donantes y 29 receptoras de

rodeo general con crías al pie. Una vez realizado el protocolo, se continuó con la implementación de ambas biotecnologías, primero la IA y luego la TE.

El establecimiento se encuentra muy bien equipado, cuenta con las instalaciones necesarias para un adecuado manejo de los animales (cepo, manga, corrales de aparte y demás) y a su vez presenta un tráiler, que es utilizado como laboratorio. Éste posee una zona sucia y otra limpia (en esta última se lleva a cabo la manipulación del embrión y del semen), baño, luz (proporcionada por un generador), agua, heladera, aire acondicionado, platinas térmicas, microscopio, lupa y todas las herramientas que se utilizan para el desarrollo de ambas biotecnologías.

Durante las prácticas, se realizaron diferentes actividades las cuales fueron previamente planeadas y registradas en planillas, cuyo desarrollo formaron parte de este TFG. Al final de cada tarea se llevó a cabo un pequeño resumen de lo hecho, rescatando lo más importante y organizando la actividad para el día siguiente. Además, se hizo un recuento de las drogas utilizadas, cantidad y remanentes de las mismas, ya que algunas de ellas necesitan ser almacenadas en heladera.

Las hembras bovinas de esta estancia son de gran mansedumbre. El personal a cargo realiza el manejo de las mismas contemplando y respetando el bienestar animal, los animales son arreados de manera tranquila, evitando los gritos y sin la utilización de perros. Una vez en la manga, son sometidos a varios días consecutivos de inyecciones necesarias para abordar las biotecnologías, por lo que para reducir los efectos estresantes en las hembras se realiza un masaje previo en el sitio de inyección. Luego de finalizada cada actividad son llevadas a cuadros implantados con pasturas consociadas (trébol blanco, trébol rojo, festuca, raigrás y pasto ovillo) con sus respectivas fuentes de agua.

Objetivos del TFG

Con el desarrollo de este TFG se pretenden alcanzar los siguientes objetivos:

- Brindar información actualizada sobre las biotecnologías reproductivas más frecuentemente utilizadas en ganado bovino de carne.
- Difundir las biotecnologías reproductivas en ganado bovino de carne más implementadas en la Patagonia.
- Establecer las ventajas y desventajas en la implementación de las biotecnologías reproductivas en ganado bovino de carne en la Patagonia.

Generalidades de la Patagonia

La Patagonia Argentina, se encuentra al sur del continente americano. Se extiende entre las latitudes 40° y 55° S, y desde el océano Atlántico hasta la cordillera de los Andes, al oeste. Está delimitada en la región norte, desde el este hacia el oeste por la línea que integra la desembocadura del Río Colorado en el mar argentino, continuando con el cauce del Río Grande y Río Barrancas que forman la frontera entre las provincias de Neuquén y Mendoza. La Patagonia está integrada por las provincias de Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del fuego.

La fisonomía de sus paisajes consiste en mesetas y cerros de superficie aplanada. El tipo de suelo de la región se caracteriza por cerros de origen glacio-fluvial (“tehuelches patagones”) de piedras y rocas erosionadas. Estos sistemas forman un pavimento desertificado debido a los fuertes vientos, los cuales impiden la deposición de materiales sobre su superficie (Klich. G. M., 2017).

Los fuertes vientos soplan del oeste a lo largo de todo el año, los cuales pierden su humedad (proveniente del Océano Pacífico) cuando atraviesan la Cordillera de los Andes, dando como resultado, que las precipitaciones en los pastizales patagónicos solo alcancen los 100 a 200 mm anuales. Las lluvias ocurren en las estaciones de otoño-invierno (Klich. G. M., 2017).

La Patagonia presenta un clima templado-frío, la temperatura promedio anual varía entre 6°C y 14°C, y los valores absolutos máximos y mínimos oscilan entre 30°C y 40°C y -15°C y -20°C, respectivamente. Las condiciones de bajas precipitaciones, fuertes vientos y elevadas temperaturas estivales determinan la situación de sequía en la región patagónica (Klich. G. M., 2017).

En cuanto a la vegetación patagónica se presenta como una estepa arbustiva baja que alterna con pastos duros, la familia que predomina es la Gramínea, y dentro de ella el género *Stipa* y *Poa*. Cubriendo grandes extensiones de superficie se hallan arbustos de una altura menor a 1 metro, las especies más frecuentes son *Chuquiraga avellanadae*, *Colliguaya intergerrima*, *Mulinum spinosum*, entre otras.

Según Aguiar y otros (citado por Klich. G. M., 2017) las especies de plantas de la Patagonia se clasifican en función de su crecimiento en tres formas: arbustos, pastos y herbáceas. Los arbustos están formados por especies siempre verdes y deciduas, con una altura que supera los 0,5 m y, en general, sin la presencia de un tallo principal bien desarrollado. Los pastos de crecimiento cespitoso tienen follaje tieso verde todo el verano. Las herbáceas incluyen especies dicotiledóneas anuales o perennes en general, siempre verdes o deciduas.

Con respecto a la producción ganadera, la concentración de bovinos en la región pampeana permitió que se llevara a cabo el proceso de mestización de la raza criolla por el cruzamiento de las hembras con toros reproductores de las razas británicas Shorthorn, Hereford y Aberdeen Angus, reduciéndose paulatinamente el número de bovinos criollos en estado de pureza racial en la zona templada, para ir a poblar aquellos ambientes donde razas introducidas no resultaron productivas (Martínez et al., 2020).

Según Rearte (citado en el por Klich G. M., 2017), entre los años 1990 y 2010, la ganadería bovina fue removida de la zona pampeana hacia las marginales debido a que las superficies de tierra con mayor aptitud comenzaron a ser utilizadas para la agricultura. El cambio además se evidenció en la manera de crianza de los animales en la región patagónica, los cuales pasaron de ser una producción netamente pastoril, es decir una producción extensiva, a un confinamiento o engorde a corral, llevando así a la intensificación del sistema de producción (Klich G. M., 2017). Esto se debió en parte al desplazamiento, pero también a las opciones productivas ganaderas más eficientes y al cambio en el valor relativo de los alimentos para el ganado.

Teniendo en consideración la situación actual de movilización del ganado, el territorio argentino por cuestiones sanitarias se encuentra delimitado en zonas. Esta delimitación se ejecutó con el fin de poder aplicar las estrategias definidas en el Plan Nacional de Erradicación de la Fiebre Aftosa (FA) (Resolución SENASA 5/2001).

La OIE (Organización Internacional de Epizootias) divide a la República Argentina en cinco zonas (Imagen 2): tres zonas libres sin vacunación de FA y otras dos zonas libres con vacunación de FA.



Imagen 2: Zonas Libres de Fiebre Aftosa reconocidas por OIE.

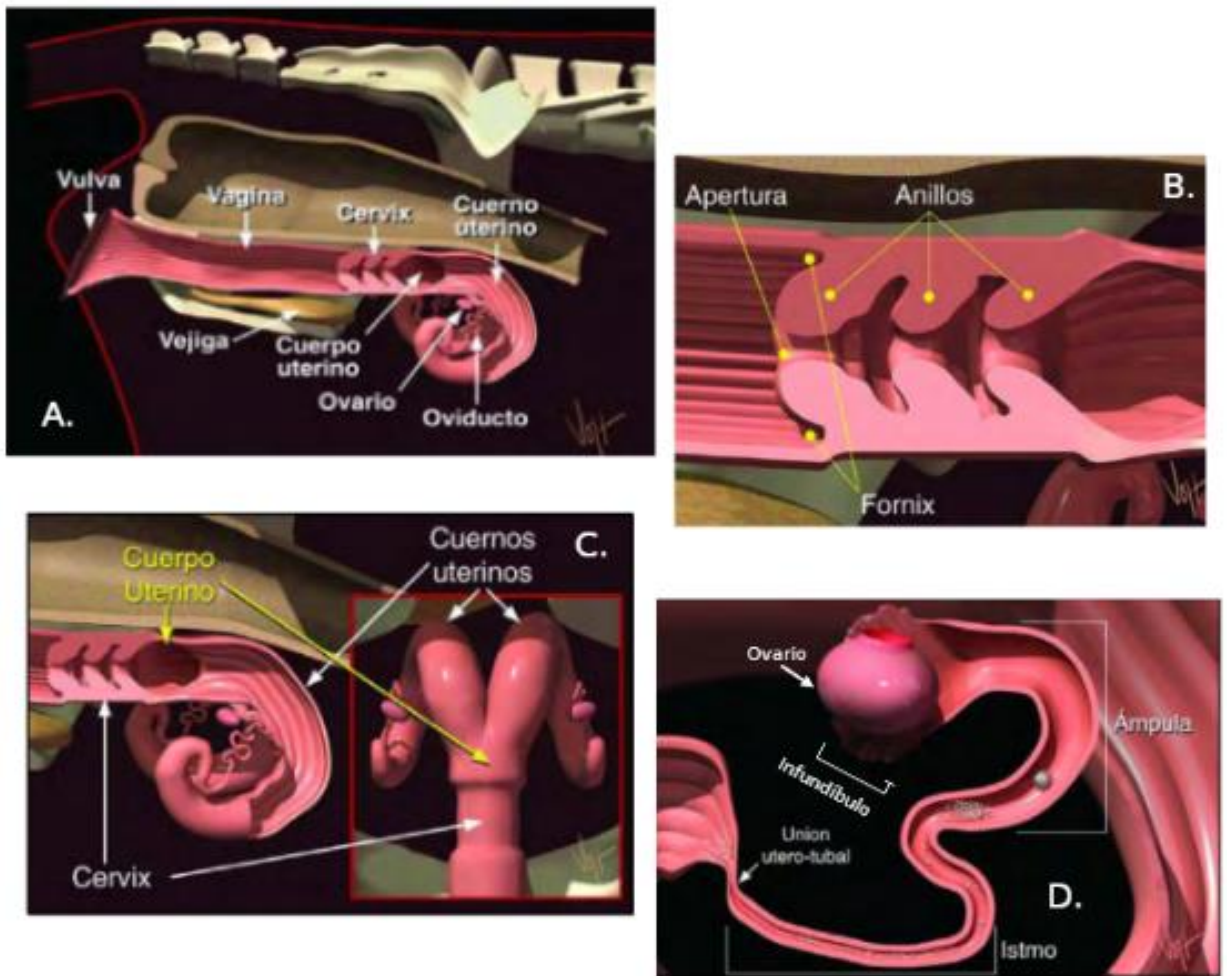
Fuente: SENASA. "Fiebre Aftosa. Estatus sanitario de la Argentina para Fiebre Aftosa".

- 3 zonas libres sin vacunación:
 - Patagonia: en el 2007 la OIE otorga la ampliación de esta zona por la unión de Patagonia Norte B y Patagonia Sur. Las provincias que la conforman son Santa Cruz, Tierra del Fuego, Antártida e islas del Atlántico sur, Chubut y parte de las provincias de Río Negro y Neuquén (imagen 2 color marrón claro).
 - Patagonia Norte A: las Provincias que la conforman son Río Negro, Neuquén y Buenos Aires (Partido de Patagones). En mayo de 2014 la OIE otorga la condición de zona libre de FA sin vacunación al área comprendida entre los ríos Colorado y Negro (imagen 2 color verde)
 - Valle de Calingasta: en la Provincia de San Juan (imagen 2 color rojo)
- 2 zonas libres con vacunación:
 - Centro – Norte (Imagen 2 color beige).
 - Cordon fronterizo (Imagen 2 color marrón oscuro).

Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina

El aparato reproductor de la hembra bovina se encuentra apoyado en el piso pélvico y tiende a caer hacia la cavidad abdominal cuando tiene una preñez avanzada. Está conformado por órganos internos y externos: los órganos internos (esquema 1) son los ovarios, oviducto, útero (cuerno, cuerpo y cuello), vagina y vestíbulo, mientras que los órganos externos son los labios vulvares y el clítoris. Es importante resaltar que los órganos internos se encuentran sostenidos por el ligamento ancho del útero, el cual se forma a partir de peritoneo y se divide en mesovario, que sostiene al ovario; mesosálpinx, que soporta al oviducto y mesometrio, que sostiene al útero.

Los órganos del aparato reproductor son tubulares pudiéndose distinguir cuatro capas de tejido denominadas de adentro hacia afuera como mucosa (capa de epitelio secretorio), submucosa (soporta a la mucosa y contiene la irrigación e inervación), muscular (dos capas de músculo liso) y serosa (capa simple de células que son continuación del peritoneo). En el útero los nombres de estas capas son: endometrio (abarca a la mucosa y a la submucosa, que contienen las glándulas uterinas), miometrio (muscular) y perimetrio (serosa) (Boeta M. et al., 2018).



Esquema 1: Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina. A. Corte longitudinal del aparato reproductor completo. B. Corte longitudinal del cérvix donde se visualiza fondo de vagina y cuerpo del útero. C. Corte longitudinal y vista dorsal del útero. D. Corte longitudinal del oviducto y vista lateral del ovario. Creado con BioRender.com.

Fuente: Nebel, R., & DeJarnette, M. (2011).

- Ovario: presenta una forma ovóide y pesa 12-20 gramos. Tiene dos funciones: la producción de óvulos y de hormonas como estrógenos y progesterona durante los distintos estadios del ciclo estral. El número de folículos que maduran son 1-2 por ciclo estral. Con bolsa ovárica ancha y abierta.
- Oviducto: conecta el útero con los ovarios, algunas de sus funciones son la captación del ovocito, ser el sitio de fertilización y ser un reservorio espermático. Presenta una longitud de 25 cm. Está formado por tres partes: infundíbulo (rodea a los ovarios, y recoge al ovocito evitando que estos caigan en cavidad abdominal), ampolla o ámpula (sitio de fecundación) e istmo.

- Útero: es bicorneal con una fusión moderada, la longitud de los cuernos es de 35-40 cm, mientras que la del cuerpo entre 2-4 cm y un cérvix de 8-10 cm con paredes gruesas que establece la conexión entre la vagina y el útero.

La entrada al cérvix está proyectada hacia la vagina en forma de cono. Esto forma un círculo ciego de 360° que rodea completamente la entrada del cuello. Esta base ciega del cono es conocida como fómix. El cuello uterino presenta 3 a 4 anillos prominentes (su función principal es proteger al útero del medio ambiente exterior).

- Vagina: longitud de 25-30 cm. Sirve como órgano copulatorio y forma parte del canal blando del parto.
- Vulva: es la apertura externa del aparato reproductor. Tiene tres funciones principales: dejar pasar la orina, abrirse para permitir la cópula y sirve como parte del canal de parto. Incluidos en la estructura vulvar están los labios y el clítoris (Nebel R. et al., 2011).

Fisiología y endocrinología del aparato reproductor de la hembra bovina

Cuando la hembra alcanza la pubertad una serie recurrente de eventos comienza denominados ciclos estrales, los cuales indican el inicio de la receptividad sexual, también se los conoce como estros, calores o celos. Estos eventos se caracterizan por una serie de cambios ováricos, genitales, endocrinos y conductuales (Rangel L. et al., 2018).

El ciclo estral se define como el período comprendido desde la aparición de un estro hasta el comienzo del siguiente (Atuesta J. et al., 2011). La hembra bovina es poliéstrica continua (presenta ciclos todo el año), con ciclos estrales cada 21 días (rango entre 17-24 días) en promedio (Colazo M. G. et al., 2017). Los cambios ováricos, genitales y conductuales que ocurren a lo largo de los ciclos estrales están controlados por el sistema endócrino y son el resultado de una compleja interacción entre el hipotálamo, la hipófisis, el ovario y el útero (Rangel L. et al., 2018).

A nivel hipotalámico, se halla un péptido denominado kisspeptina. Las neuronas que lo producen reciben información ambiental, es decir del exterior, pero también del propio organismo por ende, se lo conoce como un regulador central. La kisspeptina es un potente estimulador de la secreción de GnRh (Hormona liberadora de gonadotropina), ya que según Gottsch et al. (2004) (citado por Colazo M. G. et al., 2017) las neuronas secretoras de GnRh tienen receptores para este péptido.

Además, la kisspeptina se encuentra regulando el inicio de la pubertad, así como también la estacionalidad reproductiva. Es inhibida en la lactancia y como consecuencia se bloquea la actividad reproductiva de las hembras bovinas en esta etapa (Rangel L. et al., 2018).

La GnRh es un decapeptido producido en las neuronas del área ventromedial y del área preóptica del hipotálamo. La misma es secretada de dos formas: una secreción pulsátil o tónica desde el centro tónico del hipotálamo y una secreción cíclica preovulatoria de GnRh, la cual es estimulada por la kisspeptina (Colazo M. G. et al., 2017).

Según Callejas (1995) (citado por Delgado P. A. M. et al., 2011) el sistema tónico produce el nivel basal circulante y siempre constante de hormonas hipofisarias encargadas del desarrollo de los elementos germinales y endocrinos del ovario, mientras que el sistema cíclico es de función aguda, siendo activo solo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de las hembras “generalmente en el estro”, este modo tiene la función de generar la dehiscencia folicular.

La GnRh llega a la adenohipófisis a través del sistema porta hipotálamo - hipofisario y estimula la producción y liberación de Hormona Luteinizante (LH), de modo que un pulso de LH siempre es precedido por un pulso de GnRh. Los estrógenos (E2) foliculares tienen, por otra parte, un efecto de retroalimentación positiva con la LH al incrementar la producción de GnRh por el centro cíclico y la formación de sus receptores en los gonadotropos de la hipófisis, esto se genera en ausencia del cuerpo lúteo (ausencia de progesterona circulante). Como resultado, se logra la maduración de los folículos ováricos y se alcanzan los picos preovulatorios de estradiol y de LH. En presencia de cuerpo lúteo los estrógenos actúan como retroalimentación negativa.

La Hormona Folículo Estimulante (FSH) es liberada por los gonadotropos hipofisarios, dicha secreción no requiere de la acción de GnRh, ésta solo participa estimulando su síntesis, ya que la FSH se secreta en forma constitutiva, es decir de manera constante, pero presenta estímulos inhibitorios provocados por los estrógenos y la inhibina producidos por los folículos en desarrollo, sobre todo por el folículo dominante.

Los folículos en desarrollo necesitan principalmente FSH durante la fase de reclutamiento hasta llegar a un tamaño de 8.5 mm de diámetro en la vaca *Bos Taurus* (Ginther et al., 1996) y de 6.2 mm en la vaca *Bos Indicus* (Gimenes et al., 2005; Sartorelli et al., 2005). Después de este tamaño, el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa y se dice que su crecimiento hasta la ovulación pasa ser LH dependiente (revisado en Mihm y Evans, 2008).

La Progesterona (P4) es una hormona esteroidea producida por el cuerpo lúteo ubicado en el ovario y es la inhibidora de la secreción de LH. La inhibición es llevada a cabo tanto de manera indirecta como directa. La manera indirecta consiste en la inhibición de la secreción de

GnRh a nivel hipotalámico, mientras que la acción directa es ejercida a nivel hipofisiario bloqueando la formación de receptores a GnRH en las células gonadotropas.

Dicha inhibición da como resultado la disminución de la frecuencia de los pulsos de LH (1 pulso cada 3-4 horas, de alta amplitud, pero baja frecuencia) que se mantienen a niveles basales capaces de participar en la formación y el mantenimiento del cuerpo lúteo, pero incapaces de provocar la ovulación (Rangel L. et al., 2018).

Según lo expuesto por Ginther (1974) (citado por Colazo M. G. et al., 2011) después de un período de 12-14 días de exposición a altos niveles séricos de P4, el cuerpo lúteo regresa en respuesta a la Prostaglandina F2 alfa secretada por el útero que llega al ovario a través de un mecanismo de contracorriente y da lugar al inicio del proestro. La regresión del cuerpo lúteo hace alusión a la lisis de este que consiste en la desintegración funcional y estructural.

La desintegración funcional hace referencia a la caída en las concentraciones de P4, mientras que la desintegración estructural abarca la regresión anatómica de la estructura lútea y recuperación del tamaño normal del ovario. La desintegración funcional, con la consecuente caída en las concentraciones de P4 se presenta antes de que se observe la regresión estructural (Rangel L. et al., 2018).

Para una fácil comprensión, el ciclo estral se encuentra dividido en dos fases: la fase folicular y la luteal (esquema 2).



Esquema 2: Fases del ciclo estral bovino. Creado con BioRender.com.

A su vez, en cada ciclo estral se producen dos o tres oleadas u ondas foliculares, en las cuales se evidencia el periódico y sincrónico crecimiento de un grupo de folículos antrales. En

el ganado bovino, la emergencia de la onda se caracteriza por el repentino crecimiento de un número variable de folículos (de 8 a 41). En los primeros 2 días, la tasa de crecimiento es similar entre todos los folículos de una onda (reclutación), luego se seleccionará (selección) un folículo que continuará el crecimiento (folículo dominante) mientras que el resto de los folículos (folículos subordinados) se atresian.

En ciclos estrales de 2 y 3 ondas, la aparición de la primera onda folicular ocurre constantemente en el día de la ovulación (que es comúnmente designado como día 0). La aparición de la segunda onda se produce en el día 9 o 10 en los animales con ciclos de 2 ondas y en el día 8 o 9 en los animales con ciclos de 3 ondas. En los ciclos de 3 ondas, la tercera emerge en el día 15 o 16 (Colazo M. G. et al., 2017)

Según lo expuesto por Bergfelt et al. (1991) (citado por Colazo M. G. et al., 2017) las ondas foliculares que emergen durante la fase luteal del ciclo permanecerán anovulatorias hasta que ocurra la luteólisis, luego de este evento el folículo dominante proveniente de dicha onda se convertirá en el folículo ovulatorio. Para que la ovulación de dicho folículo se concrete se requiere que disminuyan las concentraciones P4 (debido a la lisis de CL) y aumenten las concentraciones de E2. Este aumento provoca la retroalimentación positiva que desencadena el pico de LH necesario para que en aproximadamente 27-28 horas después de este pico se produzca la ovulación (Rangel L. et al., 2018).

El comportamiento sexual característico se debe en parte al ambiente endocrino del organismo de la hembra y también al medio externo que la rodea. La conducta sexual distintiva está limitada a la etapa del ciclo estral conocida como el estro, siendo éste el periodo de receptividad sexual. En este periodo se producen cambios debido a las altas concentraciones de E2 provenientes de un gran folículo en desarrollo. Los cambios que se generan son:

- Proliferación uterina: fase proliferativa tanto del endometrio como de las glándulas endometriales.
- Contracción muscular: el útero se halla turgente.
- Secreción: moco cervical cristalino y con cierta viscosidad (imagen 3) el cual tiene la finalidad de favorecer el ascenso hacia el útero de los espermatozoides, pero a su vez retener a aquellos que no son viables para que sean fagocitados o eliminados junto con las secreciones vaginales.
- Aumento de irrigación: hiperemia y edema vulvar.
- Conductuales: mayor actividad de locomoción, frecuentes micciones, montas entre hembras (imagen 4), topeteos antes de las montas y aumento de vocalizaciones.



Imagen 3: Moco cervical cristalino. **Imagen 4:** Monta entre hembras.

Fuente: Propia.

En los bovinos de carne se sugiere que tanto la hembra que monta, como la que es montada, se encuentran en estro; a diferencia del ganado de leche, en el cual se considera que el animal que monta está próximo a entrar en celo, mientras que el que se deja montar está en celo (Rangel L. et al, 2018).

Generalidades de la Inseminación Artificial (IA)

A fin de caracterizar la IA, se puede decir que es una técnica que consiste en depositar semen en el cuerpo del útero. El desarrollo de la técnica se basa en introducir una mano por el recto de la hembra bovina, fijar el cérvix uterino y con la otra mano libre se introduce la pistola de inseminación por vagina, se enhebra el cérvix y se llega al cuerpo uterino, donde se descarga el semen (DeJarnette M. et al., 2004).

Debe tenerse en cuenta que el cérvix uterino constituye una barrera anatómica, también conocida inadecuadamente como reservorio primario o no funcional (Palma G. A., 2008) ya que muchos espermatozoides se pierden en este sitio por la anatomía del cuello (criptas y pliegues), el mucus cervical, el tono y el movimiento del aparato reproductor femenino, por ende, se busca depositar el semen pasando el cuello uterino.

Hay diferentes protocolos para realizar IA, a través de la sincronización de celos que se basa principalmente en la detección de celo (esté método es más utilizado en el ganado lechero) y los de sincronización de la ovulación (Inseminación Artificial a Tiempo Fijo – IATF). Cada protocolo tiene sus particularidades y dependerá de las necesidades de cada tipo de explotación la selección e implementación de alguno de ellos.

La IA trae aparejadas ciertas ventajas, tales como, aportes en el mejoramiento genético del ganado bovino, así como también elevación del estatus sanitario de los animales. Otras ventajas son la disminución del número de machos dentro de un rodeo facilitando el manejo de este, la criopreservación del semen obtenido para inseminar en otro momento o ser exportado y uso de semen sexado. Mientras que sus desventajas son la necesidad de personal capacitado para su implementación y en el caso de ser a detección de celo que haya suficiente personal disponible en los momentos requeridos.

Previamente al inicio de un programa de IATF se debe contar con información acerca del estado sanitario de los vientres. Dentro las enfermedades reproductivas se encuentran las venéreas como: Campylobacteriosis y Tricomoniasis, las enfermedades abortivas como: Brucelosis, Leptospirosis y Diarrea Viral Bovina (DVB), Herpesvirus bovino Tipo 1 (Rinotraqueitis infecciosa bovina - IBR) y las enfermedades abortivas emergentes producidas por: *Neospora caninum*, *Mycoplasmas*, Clamidias, Ureaplasmas y *Haemophilus* (Cutiaia L. E., 2006).

Así como también obtener información acerca de la sanidad de los machos donantes de semen debido a que el herpesvirus bovino, la DVB y *Leptospira* pueden estar presente en el semen y ser éste un medio de eliminación y transmisión. Además ambos virus y la espiroqueta sobreviven a la criopreservación. La DVB causa infección de hembras, especialmente en vaquillonas, causando fallas a nivel de la concepción, infertilidad y la difusión del virus (Lozano H., 2009).

Los patógenos transmisibles por el semen son: Aftosa, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Brucella abortus*, *Trichomonas fetus*, *Campylobacter fetus veneralis*, *Leptospira*. Otros patógenos difíciles de controlar dado que se encuentran en la población vacunada son: IBR, DVB y IP3. Por lo que es importante realizar previo a la colecta de semen una completa sanidad del macho, donde se incluya la toma de muestras correspondiente para el diagnóstico de las enfermedades mencionadas.

Por tales motivos, en el decreto número 4678/73, para los ejemplares de la especie bovina se exigirán, además de las pruebas biológicas de tuberculosis y brucelosis, las constancias de libre de vibriosas, tricomoniasis y leptospirosis.

Generalidades de la Transferencia de Embriones (TE)

La siguiente biotecnología para abordar es la TE, la cual consiste en transferir embriones obtenidos de una hembra donante hacia una hembra receptora, esta última es la encargada de llevar a cabo el crecimiento y desarrollo de este embrión hasta el día del parto.

Según lo expuesto por Gorlach (1999) (citado por Duica A. et al., 2007) el desarrollo de la TE radica en seleccionar una hembra donante genéticamente superior, a la cual se le sincroniza el estro y a su vez se superovula por medio de tratamientos hormonales, luego se insemina artificialmente a la donante y sus embriones son recuperados del útero el día 7 luego de la inseminación. El embrión obtenido, se clasifica en grados (según su estadio y calidad) y de acuerdo a dicha clasificación podrá ser o no transferido a la hembra receptora y a su vez podrá ser o no criopreservado.

Las hembras que van a recibir un embrión deben estar en el mismo período fisiológico que la donante, es decir, deben ser sincronizadas para que el ambiente uterino sea similar y de esta manera prospere la supervivencia de ese embrión. Esto se logra mediante tratamientos hormonales (Duica A. et al., 2007). Dentro de las ventajas de la TE se pueden mencionar el incremento de la producción de la hembra genéticamente superior, el rescate genético (por ejemplo, hembras con infertilidad de origen no genético), el control y la prevención de enfermedades infecciosas.

Con respecto a la prevención de enfermedades, los embriones congelados procesados de acuerdo a las normas sanitarias sugeridas por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) presentan un riesgo de transmisión de enfermedades despreciable, por lo tanto, desaparecen las barreras sanitarias haciendo posible el comercio internacional de embriones. (Munar C. J.). Según informa la IETS estas enfermedades son: Leucemia enzoótica bovina, Fiebre Aftosa, Lengua Azul, *Brucella abortus*, Encefalitis espongiiforme Bovina, IBR, Peste bovina y DVB.

El Manual del IETS expone que *“La membrana pelúcida es una barrera muy efectiva para los microorganismos. Las investigaciones han demostrado que, en la mayoría de las enfermedades de los bovinos, el lavado completo de los embriones incluidos en la zona pelúcida intacta eliminará completamente todo rastro de agentes patógenos. Hay pocas enfermedades virales específicas, en donde los agentes virales se adhieren muy firmemente a la zona pelúcida del embrión, que en el momento de hacer los lavados tienden a contaminar el mismo, por lo cual se recurre al uso de tripsina para tratar con este tipo de agentes específicos.”*

En cuanto a las desventajas de la técnica, la principal es el costo, tanto de receptoras como de los tratamientos hormonales a utilizar, las instalaciones requeridas para la realización de la práctica, la variabilidad en la calidad de los embriones, etc.

Inicio de protocolo

Los protocolos de IATF se basan principalmente en enfocar la ovulación en un período predeterminado a través de la utilización de hormonas o asociaciones de hormonas que se anticipan o prolongan el ciclo estral (Cedeño J. A. V., 2017). Esto trajo como consecuencia el desarrollo de métodos de sincronización de la ovulación para poder llevar a cabo la TE en forma sistemática o también llamada Transferencia Embrionaria a Tiempo Fijo (TETF). Según lo expuesto por Baruselli et al., Bó et al., Beal y Hinshaw y Mapletoft et al. (citado por Bó G. et al., 2011) para lograr esto es necesario controlar el desarrollo folicular y la ovulación.

Como ya se hizo mención, la ovulación es un evento factible de controlar, al igual que el desarrollo folicular el cual cuenta con tratamientos hormonales específicos para controlarlo. En este trabajo final se describe uno de los tantos procedimientos que permiten la realización combinada de ambas biotecnologías, la IATF y la TETF. Permitiendo que en momentos determinados del mismo se realicen las inseminaciones, colectas y transferencias embrionarias.

Protocolo para donantes

En las vacas donantes el día 0 (a las 18 hs. pm.) (esquema 3), se realiza tacto pre-servicio para determinar el estado fisiológico de las hembras junto con la colocación del dispositivo intravaginal con P4 e inyección intramuscular de P4 y 17 β -estradiol. La finalidad de esta combinación es que las altas concentraciones de P4 (provenientes del dispositivo y de la inyección) presentan un efecto supresor sobre la secreción pulsátil de LH, mientras que la FSH no es afectada. A su vez, la secreción pulsátil de LH tiene un efecto crítico en el desarrollo del folículo dominante, por lo que los pulsos de baja frecuencia afectarán su desarrollo e inducirá su regresión prematura.

Según Bó et al. (1994) (citado por Sarmiento Estupiñán J. A., 2013) el estradiol cuando se aplica al inicio del tratamiento con progestágenos, tiene la finalidad de provocar la atresia de los folículos existentes, para así inducir el surgimiento de una nueva oleada folicular entre 3 y 5 días (4,5 días) (Bó G. et al., 2011) después de su aplicación lo que asegura la presencia de un folículo nuevo y un ovocito viable al finalizar el tratamiento. Ya que, en presencia de altas concentraciones de P4 provenientes del dispositivo, los estrógenos generan una retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo y es supresora de los folículos subordinados

En el día 3 de iniciado el tratamiento, se encuentra esta nueva onda folicular en crecimiento. En este momento se inyecta elevadas dosis de FSH con el fin de impedir que haya dominancia folicular, por lo tanto, todos los folículos reclutados crezcan. La administración de dicha gonadotropina tiene como objetivo que el animal presente un gran número de

ovulaciones, lo cual implica un mayor número de embriones. Este evento es conocido como superovulación, la respuesta a la superovulación es muy variable, ya que la misma se encuentra relacionada con un gran número de factores, propios del tratamiento, individuales y biológicos del animal (Bó G. et al., 2011).

La gonadotropina utilizada en la superovulación es un extracto pituitario porcino con cantidades similares de FSH y LH. La misma se administra dos veces al día, en dosis decrecientes por cuatro días. Esto se debe a que la FSH tiene una vida media corta de 5 horas. El extracto a elección debe ser aquel que contenga poca proporción de LH, ya que si se encuentra en niveles altos durante la hiperestimulación afecta negativamente la calidad del embrión debido a la prematura activación del ovocito previo a la ovulación (Bó G. et al., 2011).

En el día 6 de ejecución del protocolo para TETF, se aplican dos dosis (a las 8 hs. am. y 18 hs. pm.) de análogos de prostaglandina F2- α . El cual es un agente luteolítico por lo que su efecto final es la lisis del cuerpo lúteo y como consecuencia a las 36 a 48 horas se evidenciaron los signos de celo (Bó G. et al., 2011).

En el día 7 se prosigue a retirar el dispositivo intravaginal de P4 y se administra la última dosis de FSH (extracto pituitario).

El día 8 se coloca GnRh y se realiza la primera IA. Los objetivos de administrar GnRh son: inducir la ovulación a través de una retroalimentación positiva desencadenando el pico preovulatorio de LH (Palma G. A., 2008), homogeneizar las ovulaciones (sincronicidad entre las ovulaciones), producir mayor número de ovocitos fertilizados y obtener embriones grado 1 y 2 (Bó G. et al., 2011).

Las vacas normalmente presentan estro 36 a 48 horas después de la prostaglandina F2- α y son inseminadas a las 12 y 24 horas de iniciado el estro o 60 y 72 horas después de la prostaglandina F2- α . (Bó G. et al., 2011).

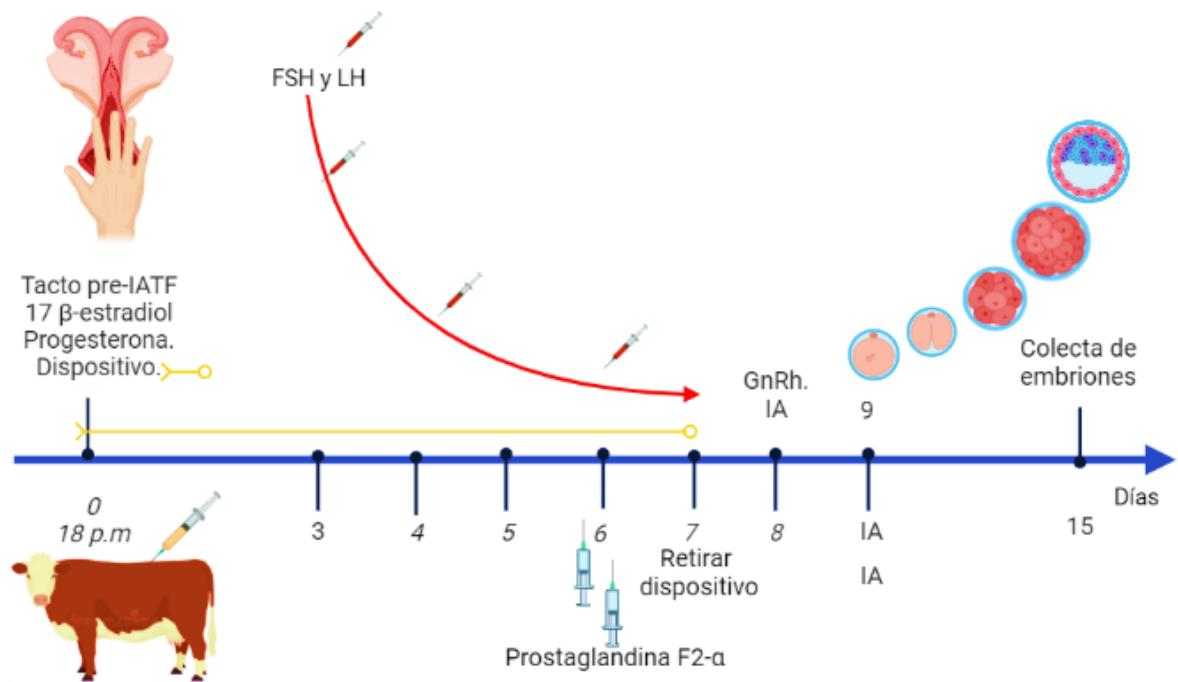
En este caso, se realizan 3 inseminaciones:

- Primer IA 58 horas después de la primera dosis de la primera prostaglandina F2- α .
- Segunda IA 72 horas después de la primera dosis de la primera prostaglandina F2- α . (día 9)
- Tercera IA 78 horas después de la primera dosis de la primera prostaglandina F2- α . (día 9).

El objetivo de inseminar en tres momentos distintos es lograr la fecundación de la gran mayoría de los ovocitos presentes en las donantes superovuladas, las cuales tienen múltiples ovulaciones con una distribución en el tiempo de las mismas variables. En conclusión, en la

mayoría de los casos hay un intervalo de hasta 12 horas entre la primera y última ovulación (Bó G. et al., 2011).

Por último, el día 15 de iniciado este protocolo, se efectúa la colecta de embriones en las vacas donantes.



Esquema 3: Protocolo vaca y vaquillonas donantes. Creado con BioRender.com.

Protocolo para receptoras

El protocolo que se emplea en las receptoras (esquema 4) comienza el día 0 (a las 8 hs. am) con el tacto pre-servicio para determinar el estado fisiológico de las hembras junto con la administración de benzoato de estradiol (BE), la colocación del dispositivo intravaginal de P4 e inyección intramuscular de P4.

La esterificación del grupo hidroxilo de 17β de estradiol-17β lleva a la protección de este grupo contra el ataque metabólico y a la prolongación del efecto. Por lo tanto, el cipionato de estradiol (CE) (C₂₆H₃₆O₃; MW 396,6) producido por la esterificación del estradiol con ácido ciclopentanopropionico, tiene una actividad biológica mucho más sostenida que el estradiol-17β (C₁₈H₂₄O₂; MW 272,4). Por otra parte, el BE (C₂₅H₂₈O₃; MW 376,5) se produce por la esterificación del carbono de la posición 3 y tiene un periodo de acción más corto que el CE pero más largo que el 17β - estradiol.

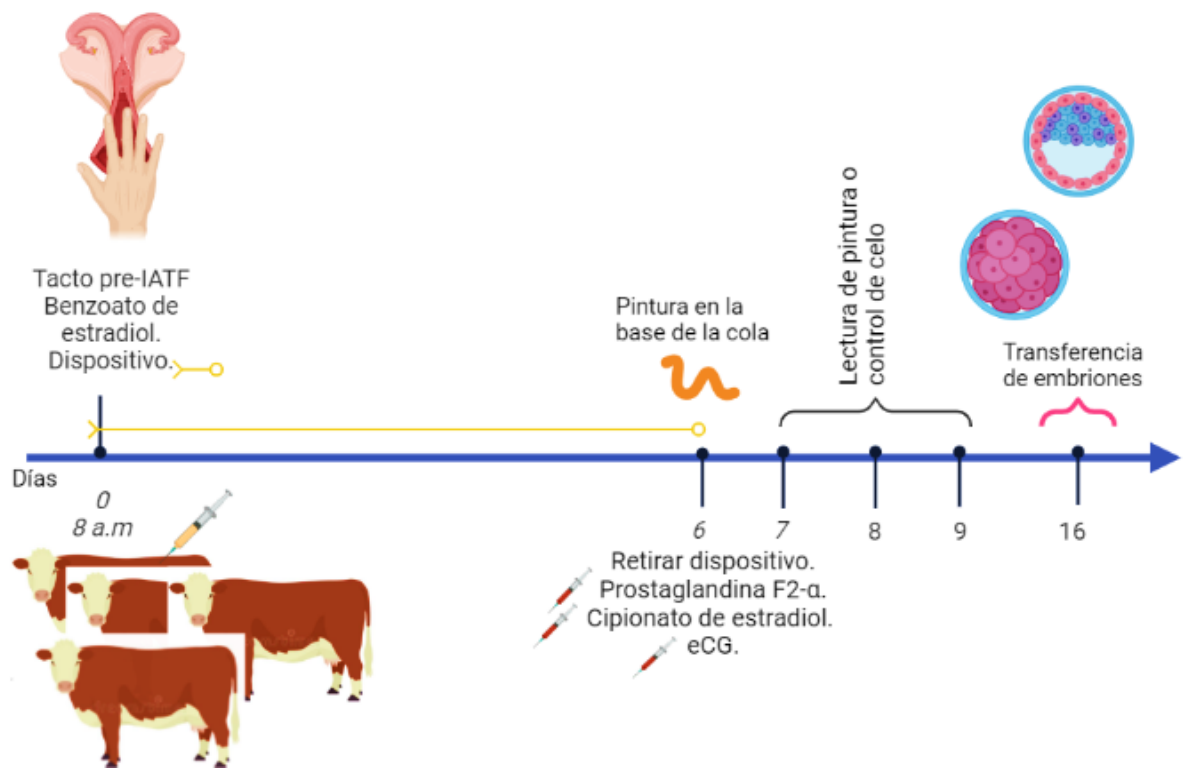
Al día 6 se retira el dispositivo y se coloca prostaglandina F2- α . (inductor de luteolisis) y CE (inductor de la ovulación). La realización de estas actividades es utilizada para la sincronización de la ovulación y eliminar la detección de celo en las receptoras. Según Bó et al. (2006) el CE puede ser utilizado para reducir el número de veces que las hembras tienen que pasar por la manga (citado por Sarmiento Estupiñán, J. A., 2013) para la aplicación de sus dosis hormonales, esto sin afectar su fertilidad (Iñiguez Montejano A. L., 2019). También se administra Gonadotropina Coriónica equina (eCG), la cuál es una glicoproteína de origen placentario de la yegua (Balcázar A. S. et al., 2018) que estimula el desarrollo folicular, lo cual eleva el número de receptoras para ser transferidas y a su vez aumenta el índice de preñez (Bó G. et al., 2011).

Según lo expuesto por Baruselli et al. (2000) y Bó et al. (2002) (citado por Cedeño J. A. V., 2017) la eCG presenta varios efectos positivos en receptoras de embriones tratadas con protocolos de TETF. Entre ellos, la formación de un CL que produce más progesterona en el día de la transferencia. Según Bó et al. (2004) probablemente el efecto más importante de la eCG es la estimulación del desarrollo de un folículo dominante de mayor tamaño que desencadena en la ovulación del mismo, lo que reditúa en una tasa ovulatoria más alta (Sá Filho et al., 2010 y Núñez et al., 2014).

Luego de las inyecciones se prosigue a pintar la base de la cola para posterior lectura de celo con su anotación correspondiente. Esta actividad se realiza durante tres días, dos veces al día. La hembra cuya base de la cola aparece despintada es aquella que presentó celo.

La finalidad de pintar la base de la cola es para detectar celo en las receptoras, ya que para lograr una tasa de preñez aceptable se deben contemplar los siguientes factores: sincronía de estros entre donantes y receptoras (debe ser dentro de las 24 horas) y adecuada calidad y estadio del embrión transferido (Bó G. et al., 2011).

En el último día del protocolo (día 16), se lleva a cabo la transferencia de embriones desde la donante hacia la receptora.



Esquema 4: Protocolo de sincronización en las hembras receptoras. Creado con BioRender.com.

Inseminación Artificial

El inicio de la técnica de IA se lleva a cabo a las 48 horas de colocada la última dosis de prostaglandina F2- α (o a las 58 horas de la primera dosis de prostaglandina F2- α). La misma se realiza con semen criopreservado, es decir, células vivas (espermatozoides) que sobreviven al proceso de congelación (Valencia J. et al., 2018).

El semen se encuentra envasado en pajuelas, las cuales son de polivinilo que pueden contener volúmenes de 0.5 y 0.25 ml (imagen 5 y 6), cada una de ellas se halla muy bien identificada. Un extremo está sellado mientras que en el otro presenta un tapón triple (algodón-alcohol polivinílico-algodón). El alcohol polivinílico del tapón se gelifica y sella la pajuela cuando entra en contacto con el líquido seminal (Cueto M. et al., 2016).



Imagen 5: Pajuela izquierda de 0,5 ml y derecha de 0,25 ml. **Imagen 6:** a. Pajuela descargada de 0,5 ml. b. Pajuela descargada de 0,25 ml. c. Pajuela llena de 0,25 ml.

Fuente: Propia.

Estas pajuelas a su vez se encuentran en canastillos dentro de un termo de congelación (imagen 7), el cual está cargado con nitrógeno líquido alcanzando una temperatura de -196°C , en donde las pajuelas pueden permanecer almacenadas por tiempo indefinido (Valencia J. et al., 2018).



Imagen 7: Termo de congelación.

Fuente: Propia.

La pajuela debe ser retirada con una pinza y lo más rápido posible, a fin de evitar que las demás pajuelas que contiene ese canastillo sufran un shock térmico. Se deja 10 segundos al

exterior resguardada de los rayos solares con el fin de que se evapore el resto de nitrógeno que queda ubicado en el extremo del tapón de la pajuela, ya que este sino es evaporado y se introduce en el baño maría, puede generar la explosión de la misma.

Se prosigue a introducirla dentro de un descongelador (imagen 8), el cual contiene agua a 35°C donde permanece por 30 segundos. Transcurrido este lapso de tiempo, es retirada, secada con un papel absorbente (el agua es espermicida) y por último se corta el extremo sellado.



Imagen 8: Descongelador con agua y termómetro.

Fuente: Propia.

Inmediatamente después, se coloca la pajuela dentro de la vaina (imagen 9) y esta última se sitúa en la pistola de inseminación (imagen 10), la cual presenta su émbolo desplazado para evitar que el estilete empujara al algodón de la pajuela y de esta manera se efectuase la descarga de semen en un momento y lugar inadecuado.



Imagen 9: Vaina de plástico.

Fuente: Propia.

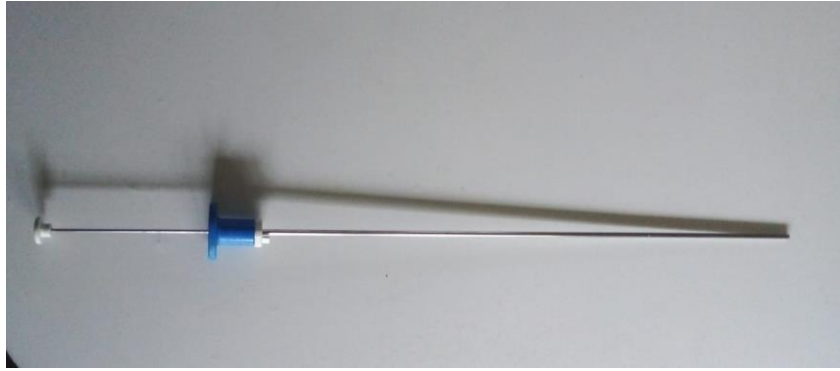


Imagen 10: Pistola de inseminación con su émbolo desplazado.

Fuente: Propia.

Inmediatamente antes de iniciar la IA se higieniza la región perianal empleando una solución yodada y papel tissue. La técnica propiamente dicha de IA es recto-vaginal, es decir una mano se introduce por el recto mientras que la pistola de inseminación es ingresada por la vulva, se la dirige hacia el techo y luego hacia el fondo de la vagina (fórnix). Con la mano que se encuentra en el recto se fija y se manipula al cérvix para que la pistola de IA vaya atravesando los anillos cervicales. Una vez atravesados, el semen es descargado en el cuerpo uterino.

Inicio de la Transferencia Embrionaria

Para dar comienzo a la TE, primero se debe contemplar que hembras van a ser seleccionadas, ya que se necesita contar con 2 grupos, uno integrado por las donantes que son aquellas hembras que se van a superovular, inseminar y por último colectar sus embriones y el otro grupo formado por las receptoras, las cuales están sincronizadas para recibir dichos embriones.

Selección de Donantes

Hay una serie de criterios a la hora de seleccionar donantes como:

- Ciclos regulares y que hayan comenzado a temprana edad.
- Entre 3 y 10 años.
- Dos o menos servicios por concepción en años anteriores.
- Comportamiento individual superior en características de importancia económica.
- Crías superiores a la media del rodeo.
- Ningún defecto genético o de conformación detectable.
- En lo posible historial de la hembra en respuestas de superovulación anteriores.
- Adecuada sanidad.

- Se pueden utilizar vacas que presentan infertilidad debido a lesiones, enfermedad o edad, sin embargo no se pueden utilizar aquellas hembras que son infértiles ya que es un carácter hereditario.

Se debe tener en cuenta que, si se quiere seleccionar una vaca con cría al pie debe tener como mínimo 60 días de parida, ciclar normalmente y con una ganancia de peso progresiva. Lo ideal es mantener las vacas en una condición corporal (CC) de 3 - 3,5 (en la escala del 1 al 5) (Bó G. et al., 2011). En este trabajo, la CC de las vacas con cría y vaquillonas es de 3,5-4 (imagen 11).

En general, se considera adecuado contar con un número de 4 a 5 donantes para realizar la TE, porque lo que se espera es que 1 vaca no responda al tratamiento, otra hembra tenga buena respuesta y las 2 vacas restantes presentan una respuesta promedio, dando como resultado entre 3-6 embriones transferibles.



Imagen 11: Grupo de donantes en corral con su cría al pie.

Fuente: Propia.

Selección de Receptoras

El éxito de la TE es una sumatoria de factores, en donde las receptoras juegan un papel muy importante tanto en el resultado del porcentaje de preñez logrado como en el resultado

económico final del programa. Por lo tanto, se debe llevar a cabo una selección de hembras que ejerzan el rol de receptoras, esta selección puede estar basada en:

- Categoría:
 - Vaquillonas primíparas: sus ventajas es que se obtienen buenos resultados de preñez, ya que al no haber gestado no existe daño del endometrio y poseen un útero fácil de manejar por su tamaño. Mientras que sus desventajas radican en posibles problemas al parto, menor producción láctea y falta de historial reproductivo de las mismas.
 - Vacas con cría al pie: adultas, de cabeza de parición, quedando demostrado su buena fertilidad. Esta categoría es la elegida para llevar a cabo la biotecnología de TE de este trabajo final (imagen 12).
 - Vaca vacía sin ternero al pie: categoría menos recomendada.
- Biotipo: el tipo de receptora a utilizar debe encontrarse adaptada al ambiente donde va a gestar y criar al ternero. Lo ideal es obtenerlas del propio establecimiento con el consiguiente conocimiento de su historia sanitaria y reproductiva. Además, son portadoras de inmunidad de los agentes patógenos locales y dicha inmunidad será pasada a sus crías (inmunidad pasiva).
- Alimentación e intervalo posparto: a través de una medición subjetiva, como lo es CC se puede determinar el balance energético de esa receptora y sus reservas de grasa. Con la medición de la CC, hembras en un puntaje de 3 y 4 (de escala de 1 al 5) presentan tasas de preñez significativamente superiores. En el caso de este trabajo, las receptoras elegidas presentan una CC de 3,5-4. Con respecto al período posterior al parto, las hembras deben tener al menos 50 días de paridas o más de 70 días si son vacas de primera parición.
- Sanidad: fundamental conocer el estatus sanitario de las receptoras con el fin de evitar pérdidas embrionarias o abortos. Se recomienda tomar muestras correspondientes para control de brucelosis, IBR, DVD, leptospirosis, entre otras que puedan interrumpir la preñez (Palma G. A., 2008).

De manera resumida, la selección de una hembra receptora se realiza con base en características sanitarias, nutricionales y reproductivas. La misma debe ser fértil, sana, que tenga más de 50-70 días posparto en el caso de que sea una hembra parida. Además, es de utilidad contar con el historial reproductivo de la hembra y que no posea alteraciones anatómicas en el aparato reproductor.

También se debe determinar el estado ovárico de esa hembra que se quiere utilizar de receptora, a través de una palpación rectal, donde solo se seleccionará aquellas que presentan estructuras ováricas como cuerpos lúteos y folículos. En la evaluación de las estructuras ováricas, por medio de ultrasonografía trans-rectal, se ha determinado que el folículo preovulatorio afecta de manera directa el subsecuente tamaño del cuerpo lúteo (CL), por lo que se espera que la hembra presente un folículo preovulatorio de mayor tamaño, que luego de la ovulación, será un cuerpo lúteo de gran tamaño. Esto se traduce, a mayores niveles plasmáticos de P4, lo que generaría condiciones uterinas más favorables para el desarrollo embrionario temprano (Duica A. et al., 2007).

En el mismo día de la TE, a la receptora se le realiza una práctica que consiste en determinar mediante palpación rectal la presencia de un CL funcional y su posterior clasificación en 3 grados (Palma G. A., 2008). Los CL se clasifican en base en su tamaño y la protuberancia sobre la superficie del ovario (Bó G. et al., 2011).

- CL de grado 1: mide $\geq 1,8$ cm de diámetro y presenta una estructura palpable que sobresale de la superficie del parénquima ovárico.
- CL de grado 2: mide 1,5 a 1,8 cm de diámetro, sin una marca estructural sobresaliente del parénquima ovárico.
- CL de grado 3: mide menos de 1,5 cm de diámetro, sin marca estructural sobresaliente del parénquima ovárico.

El tamaño del CL guarda relación con el porcentaje de preñez, ya que receptoras que presentan CL grado 1 y 2 que son transferidas con embriones no obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de preñez, en cambio en aquellas que poseen un CL grado 3, el porcentaje de preñez es significativamente menor. Por lo que las TE se realizan en receptoras que presenten un CL grado 1 y 2.

Gustavo A. Palma y Gabriel Bó et al. exponen en sus trabajos que la clasificación del CL por palpación rectal es un método orientativo y subjetivo, que lo conveniente sería determinar si la receptora presenta o no un CL funcional.



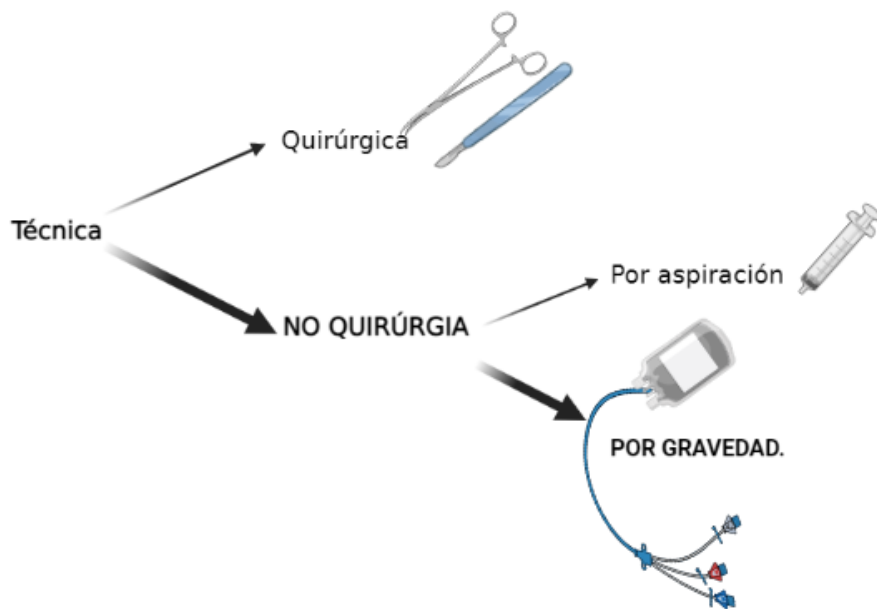
Imagen 12: Grupo de receptoras en corral.

Fuente: Propia.

Colecta de embriones

El último día del protocolo (día 15) de las donantes, se llevan a cabo tres actividades: la colecta de embriones, su transferencia y congelación.

La técnica empleada para la colecta de embriones es la no quirúrgica, que a su vez presenta tres métodos diferentes (esquema 5), el procedimiento de elección en este trabajo final es el de gravedad con circuito cerrado de dos vías (Bó G. et al., 2011).



Esquema 5: Clasificación de las técnicas de colecta embrionaria. Creado con BioRender.com.

La edad del embrión se establece a partir del día del estro (D0). Al D1 le corresponde la ovulación, de esta forma entre las 24 y 36 horas (D2) después de la fecundación en la ampolla del oviducto el cigoto comienza a dividirse en dos células. Al D3 el embrión ya cuenta con 4 células (blastómeras), hasta el estadio de 8 células (D4) el cigoto es transportado a través del oviducto y aproximadamente en el D5 el embrión ingresa al cuerno uterino en estadio de 16 células (Palma G. A., 2008).

Luego el embrión comienza a sufrir la compactación de las células presentes en su interior, este estadio recibe el nombre de mórula temprana (D6) y según lo expuesto por Lequarre (2004) y Araujo (2005) para el D7 el embrión ya se encuentra ubicado a nivel del cuerno uterino y alcanza el estadio de blastocisto. A su vez Stingfellow (2000) expone que el momento adecuado para realizar la colecta de los embriones corresponde al D6,5-7 de su evolución, donde se espera encontrar embriones en estadios de mórula y blastocisto temprano, los cuales aún conservan su zona pelúcida intacta (citado por Duica A. et al., 2007).

La técnica comienza con la colocación de la donante en el brete a la cual mediante una palpación rectal se estima la respuesta ovárica al tratamiento de superovulación, esta respuesta se evalúa contando el número de cuerpos lúteos por ovario y su posterior registro en una planilla.

Se continúa con la realización de la anestesia epidural baja (en la unión sacro coccígea o entre el primer espacio intervertebral coccígeo), la cual se lleva a cabo con lidocaína al 2% combinada con acepromacina, administrando un volumen total de 8 ml. La dosis a administrar debe ser baja para desensibilizar los nervios sacros, pero permitiendo la mantención de la función motora de los miembros posteriores necesaria para que la vaca se mantenga en pie. Se prosigue con la técnica una vez que la anestesia haya actuado sobre el animal, esto se puede evidenciar porque el mismo presenta flaccidez de la cola y falta de la respuesta del esfínter anal y vulvar al pellizco. Luego se amarra la cola y se higieniza el lugar (Palma G. A., 2008).

La higiene se realiza con una rasqueta para quitar la materia fecal seca de la región perianal, luego se avanza con la limpieza de la vulva con alcohol y su posterior secado con papel tissue. Además, los labios vulvares son abiertos de manera manual, para visualizar si el interior de la vagina se encuentra sucio, en tal caso se lleva adelante su limpieza.

Con la mano en el recto de la hembra donante se prosigue a aumentar la luz cervical con la ayuda de un dilatador cervical de acero inoxidable (higienizado y lubricado con solución fisiológica) debido a que el cérvix está cerrado ya que la vaca se encuentra en el día 7 del diestro (imagen 13 b). Luego, se sigue con la colocación de una sonda o catéter Foley de dos vías, la cual al ser blanda y flexible necesita que se le coloque un estilete metálico (imagen 13

a) en su interior para otorgarle rigidez, previo a esto se lubricaron con solución fisiológica ambos instrumentos.

Un operario realiza la apertura manual de los labios vulvares para evitar el arrastre de materia fecal existente hacia el interior de la vagina y se continúa con la introducción de la sonda a través de ésta y del cérvix. Se avanza muy suavemente evitando provocar daños en la pared uterina, hasta llegar al tercio medio de cada cuerno uterino por delante de la bifurcación uterina palpable.



Imagen 13: a. Estilete metálico. b. Dilatador cervical.

Fuente: Propia.

Una vez colocada la sonda en el sitio correcto, el balón del extremo de la sonda Foley (imagen 14 a) se llena con 5 a 10 ml de solución fisiológica estéril, el volumen a utilizar dependerá del diámetro del cuerno (imagen 15) y posteriormente se retira el estilete (imagen 14 b). Si el mismo queda correctamente colocado se procede a la introducción del medio de lavaje a través de las vías. El medio de lavado es un sachet que contiene PBS (solución salina equilibrada o Buffer Fosfato), atemperado a 37°C, el cual para que ingrese por gravedad debe ser situado por encima del animal a unos 60-100 cm de altura.

La formulación del medio de aislamiento PBS es 10% de suero fetal bovino y antibióticos, como penicilina, estreptomicina y fungizona (Bó G. et al., 2011). El suero fetal bovino utilizado sirve para evitar que el embrión se adhiera a las cánulas del sistema de lavado (Balcázar A. S. et al., 2018).

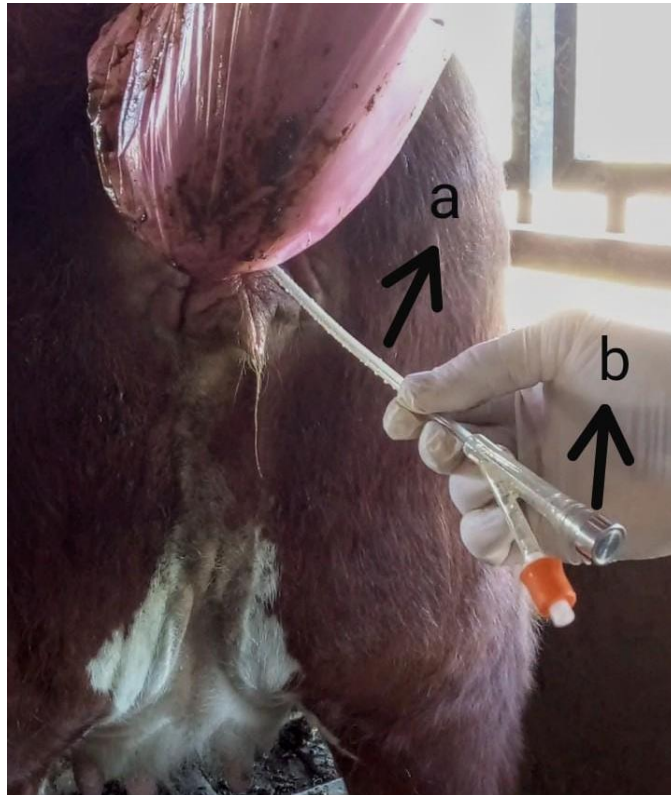


Imagen 14: a. Sonda o catéter Foley. b. Estilete metálico

Fuente: Propia.



Imagen 15: Llenado del balón.

Fuente: Propia.

Los lavajes uterinos son efectuados utilizando el método cerrado (imagen 16), donde ingresa el líquido por gravedad y la salida del mismo se efectúa por sifonaje y la propia elasticidad de las paredes uterinas. Las vías se disponen en forma de Y y se conectan a la sonda. La vía de entrada se conecta con el sachet que contiene medio de colecta (imagen 16 línea punteada roja) y la vía de salida se conecta con un filtro que retiene los embriones (imagen 16 línea punteada amarilla).

El cuerno uterino se dilata con el ingreso de 30 a 80 ml de líquido hasta que adquiere el tamaño de una gestación de 30-35 días en el caso de vaquillonas, mientras que en vacas se distiende a un tamaño de una preñez de 45 días (Bó G. et al., 2011).

Luego del ingreso de líquido al cuerno correspondiente se abre la vía de salida y se cierra la de entrada con un clamp. De esta manera los embriones del cuerno uterino son recolectados y posteriormente concentrados en el filtro de plástico, este mismo posee en la base una malla porosa de 60-80 micrones de diámetro (estos poros son más pequeños que el diámetro del embrión, el cual mide 170 micras) (Palma G. A., 2008).

Estas maniobras se repiten alternativamente hasta que hayan pasado entre 500 a 800 ml de solución por cuerno. A su vez, el líquido que queda retenido en el filtro es evacuado por la apertura de un clamp. Este líquido se conserva en una probeta con el fin de ir midiendo la cantidad de medio utilizado.

Una vez lavado el primer cuerno, se procede a vaciar el balón con una jeringa, se desacoplan las vías y se introduce un tercio del estilete metálico en la sonda. Ésta se retira del aparato reproductor, se coloca la totalidad del estilete dentro de la misma, para comenzar nuevamente con la técnica en el otro cuerno uterino. Previo al inicio de la colecta embrionaria en el cuerno contralateral (imagen 16) es necesario el lavado de las vías, sondas y estilete con el fin de disminuir la contaminación.

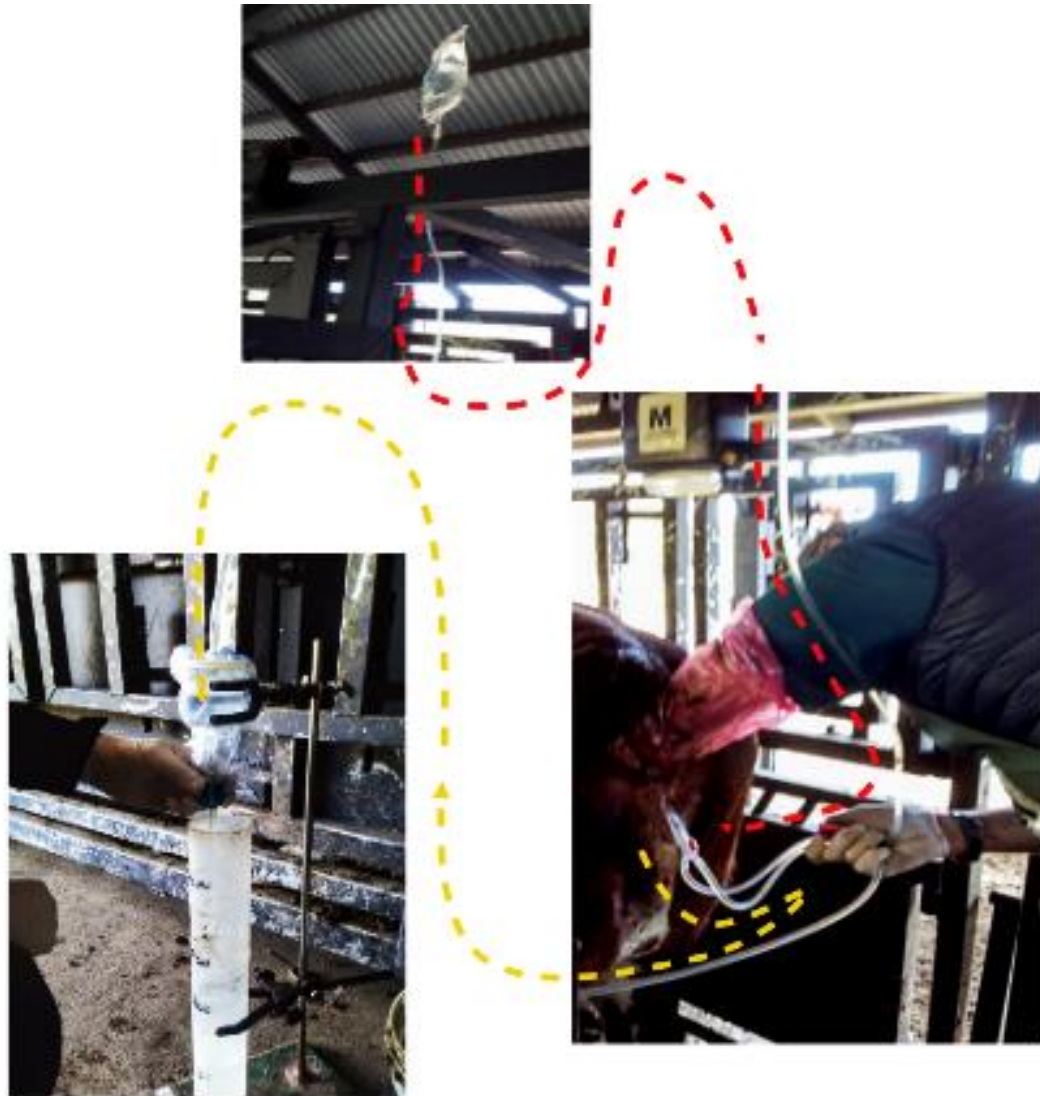


Imagen 16: Sistema cerrado de colección de embriones.

Fuente: Propia.

Búsqueda y acondicionamiento de embriones

Finalizado el lavado de los cuernos uterinos, la vía que se une al filtro se desacopla y este último pasa al laboratorio. Es necesario que el filtro se encuentre correctamente identificado, donde se debe colocar el RP (código de identificación individual del animal) de la hembra donante.

El contenido del filtro (PBS más embriones) es volcado en una placa de Petri y se realiza una limpieza a presión del mismo (imagen 17). Esto se lleva a cabo con una jeringa cargada con medio acoplada a una aguja fina y se realiza con el fin de evitar que algún embrión quede adherido ya sea a los bordes o al fondo del filtro.



Imagen 17: Limpieza a presión del filtro.

Fuente: Propia.

Una vez en la placa de Petri de 150 x 25 mm, la cual tiene en su fondo cuadrículas que facilitan la búsqueda de los embriones, se coloca bajo una lupa estereoscópica con una magnificación de 10X o 15X (imagen 18). Luego se procede a buscar a los mismos de manera ordenada en forma de guarda griega.



Imagen 18: Placa de Petri, lupa y platina térmica.

Fuente: Propia.

La identificación se realiza por la presencia de la zona pelúcida que corona la masa embrionaria, la forma esférica y la tendencia a rodar sobre el fondo de la placa. Las estructuras son levantadas con una micropipeta adaptada a una jeringa de 1 ml (imagen 19 a) y trasvasadas a una placa de Petri de 35x10 mm para su aislamiento (imagen 19 b). En este trabajo, el medio de aislamiento atemperado a 35 °C que contiene a las estructuras identificadas es el medio Holding.

Este medio se encuentra contenido en un frasco de vidrio, lo que le da más protección en temperatura y esterilidad. La solución contiene D-Glucosa, Piruvato, albúmina de suero bovino (BSA), aminoácidos, factores de crecimiento y antibióticos.

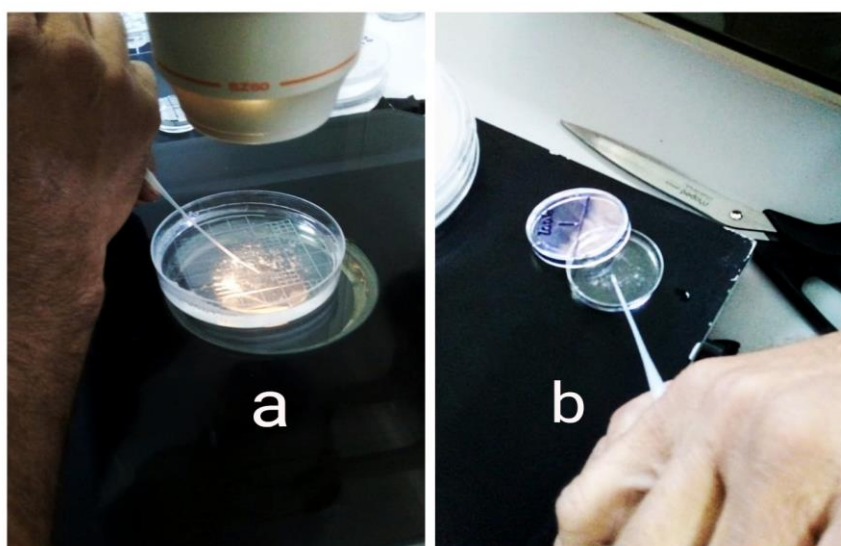


Imagen 19: Pasaje de las estructuras. Recuperación de embriones en placa de Petri de 150x25 mm. b. Aislamiento de los embriones en placa de Petri 35x10 mm.

Fuente: Propia.

Estas operaciones se efectúan a temperatura ambiente de 20°C a 35°C y los materiales y medios líquidos deben ser atemperados a 35-37°C sobre platina térmica y baño maría respectivamente. Según el manual de la IETS, los embriones colectados deben someterse a un lavado, el cual es efectivo para eliminar altos niveles de contaminación de la mayoría de los agentes patógenos de los embriones.

El procedimiento de lavado recomendado por la IETS se basa en el transporte de 10 o menos embriones desde la placa de Petri hasta un pocillo de la policubeta que contiene 10 gotas de medio (imagen 20) utilizando una micropipeta estéril y nueva para cada lavado. Los

embriones deberán ser agitados ligeramente en cada lavado y tan pronto como se haya efectuado esto se pasará al lavado siguiente. Únicamente los embriones de la misma donante deberán lavarse juntos y en el caso que dichos embriones se congelen se efectúan dos lavajes con tripsina.

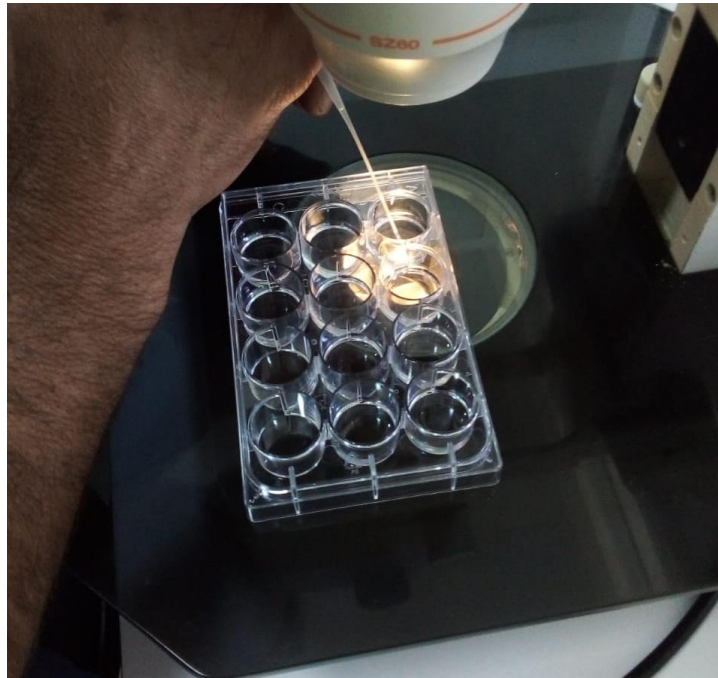


Imagen 20: Lavado de embriones.

Fuente: Propia.

Clasificación embrionaria

En este apartado se contempla la clasificación de los embriones que previamente se colectaron y acondicionaron. Esta clasificación es subjetiva y dependerá de la experiencia de quien la realiza.

La clasificación se basa en la evaluación del embrión en base a sus características morfológicas. La misma es categorizada como no invasiva ya que el fundamento es la observación de los embriones. Hay dos formas de clasificarlos, una en base a la calidad y la otra a su estadio.

Evaluación de la calidad embrionaria: se tendrán en cuenta los siguientes criterios morfológicos, los cuales se podrán determinar mediante el uso de la lupa estereoscópica:

- Forma del embrión.
- Color y textura de la masa celular.
- Número y compactado de las blastómeras.

- Diferencia de tamaño entre las blastómeras.
- Tamaño del espacio perivitelino.
- Presencia de blastómeras sueltas, degeneradas o detritus celulares.
- Presencia, número y tamaño de vesículas (indicativo de degeneración).
- Apariencia de zona pelúcida.

Clasificación en base a la calidad embrionaria (Palma G. A., 2008):

Grado I: Excelente: embrión ideal, no existen defectos visibles, esférico, simétrico. Las blastómeras son claramente visibles, de color y textura uniforme. Zona pelúcida intacta.

Grado II: Bueno: el embrión tiene muy pocas blastómeras desprendidas de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares. Forma ligeramente irregular.

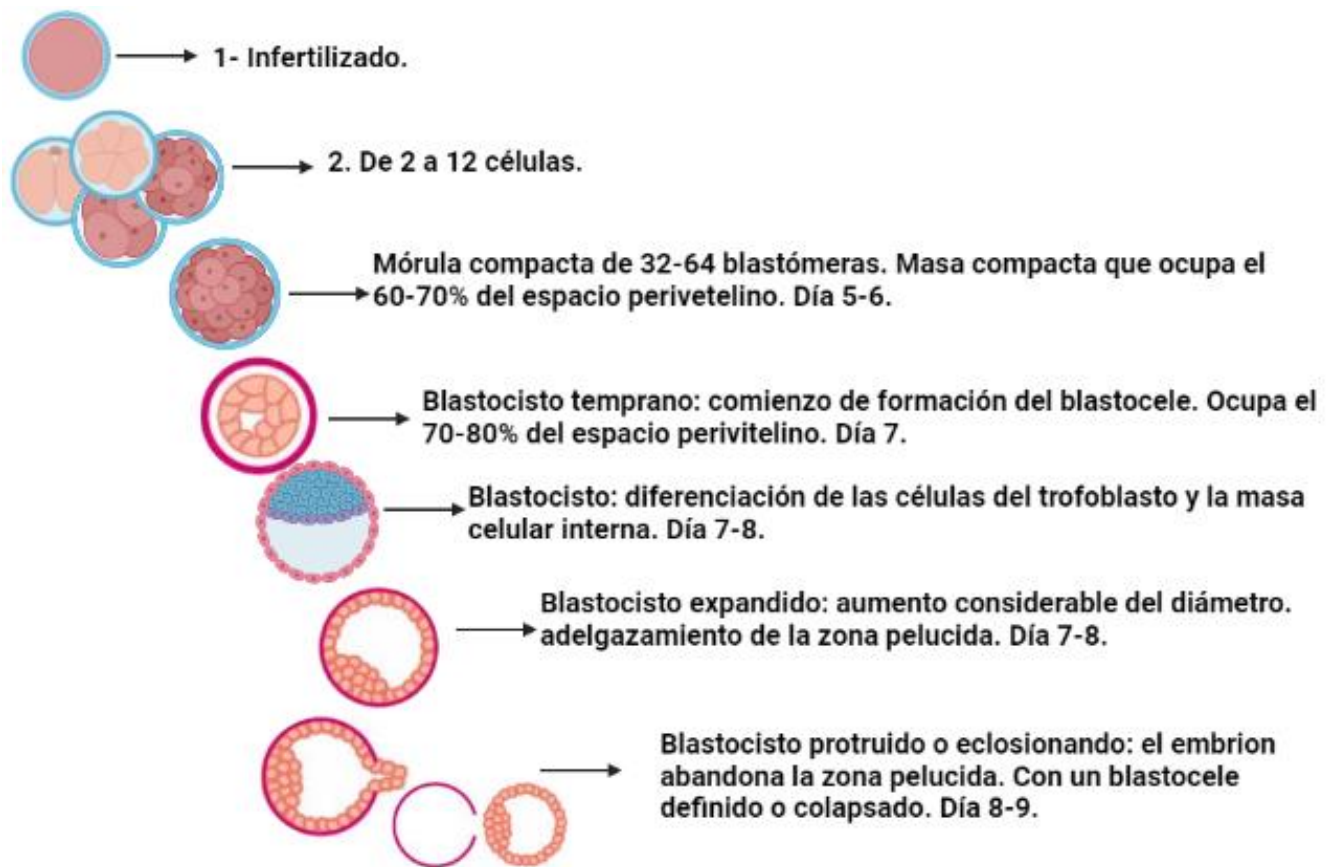
Grado III: Regular: embrión con varios defectos, detritus celulares, forma irregular, presencia de blastómeras sueltas y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida.

Grado IV: Malo: presencia de muchos defectos, numerosas blastómeras sueltas, células degeneradas, asimetría celular y numerosas vesículas. Puede evidenciarse una seria ruptura de la zona pelúcida. Esta categoría es clasificada como no transferible.

Grado V: Degenerados: blastómeras desorganizadas y sueltas. Células de apariencia vesicular, granular o de crecimiento retardado (Bó G. et al., 2011).

Grado VI: Infertilizados: de apariencia granular (puntillado) rodeados por una membrana vitelina lisa y si está rota el puntillado cubre completamente el espacio vitelino (Bó G. et al., 2011).

En el esquema 6 se encuentra descripta la clasificación en base al grado desarrollo de los embriones:



Esquema 6: Estadios de desarrollo embrionario. Creado con BioRender.com.

Los embriones colectados el día 15 en las prácticas de este trabajo final se encuentran en estadios de mórula compacta y mórulas con blastómeras sueltas, además de blastocisto temprano (imagen 21 y 22).



Imagen 21: 13 embriones estadio mórula compacta y 1 blastocisto temprano. Calidad I.

Fuente: Propia.

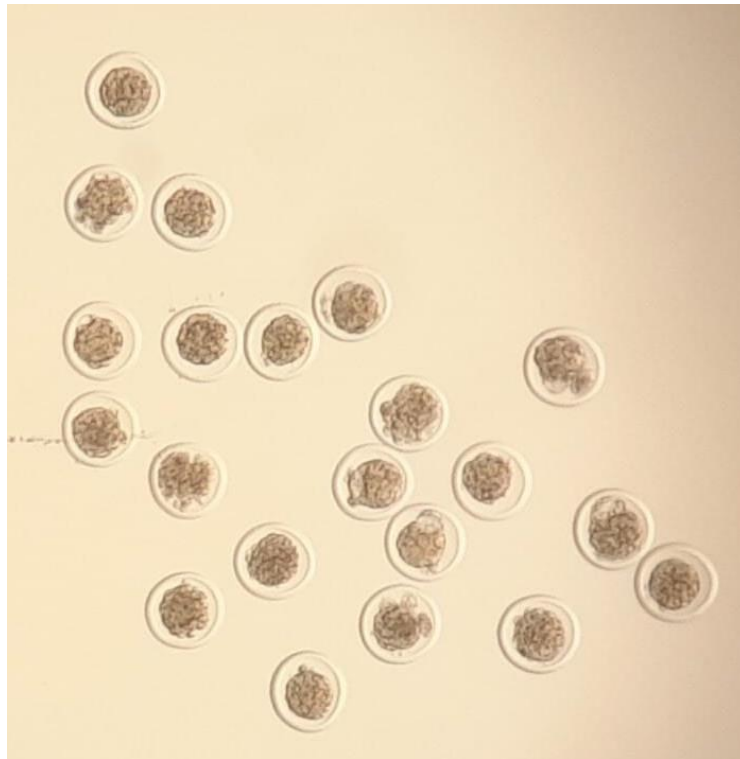


Imagen 22: Mórulas compactas, mórulas con blastómeras sueltas y blastocistos tempranos.

Fuente: Propia.

Como ya se mencionó, en las vacas superovuladas existe una diferencia horaria entre la primera ovulación y la última, generando que la fecundación de los ovocitos no se de en el mismo momento dando como resultado embriones en diferentes estadios (Palma G. A., 2008).

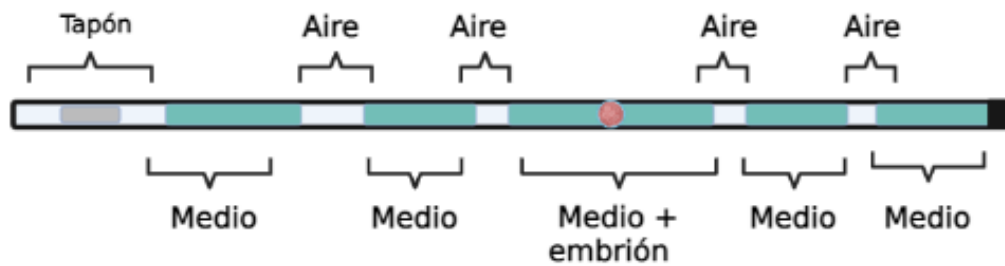
En base a dicha clasificación, se determina el destino del embrión obtenido. Los embriones de calidad I son los mejores para criopreservar, mientras que los de calidad II pueden ser congelados con pobres resultados, pero su transferencia en fresco presenta resultados aceptables. Por último, los de calidad III no se deben congelar y su uso para transferencia en fresco muestran índices de preñez regulares a malos (Bó G. et al., 2011).

No obstante, según Elsdén y Seidel (1990) (citado por Palma G. A., 2008) existen casos de embriones clasificados como excelentes y transferidos correctamente los cuales no concluyeron en una preñez, mientras que embriones de muy baja calidad y transferidos con dificultad terminaron en una preñez y posterior nacimiento normal. Por lo que el éxito en la implementación de esta biotecnología no sólo se encuentra vinculado con el origen y tratamiento del embrión, sino también con la importancia de la receptora en la viabilidad del embrión transferido y la calidad en la comunicación embrio-materna (Palma G. A., 2008).

Armado de pajuela embrionaria para transferencia en fresco

Luego del acondicionamiento y clasificación de los embriones se avanza con el armado de la pajuela, la misma es de 0,25 ml y el embrión es colocado de la siguiente forma (esquema 7):

- Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo.
- Aspiración de aire (se visualiza en la pajuela como una burbuja).
- Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo.
- Aspiración de aire.
- Aspiración del embrión con un pequeño volumen de medio de cultivo.
- Aspiración de aire.
- Aspiración de medio.
- Aspiración de aire.
- Aspiración de medio de cultivo hasta llenar la pajuela.



Esquema 7: Llenado de pajuela. Creado con BioRender.com.

Se procede primero a lavar la pajuela con medio con el fin de remover restos de soluciones esterilizantes utilizadas que son nocivas para el embrión. Las columnas de aire impiden el desplazamiento de la columna que contiene al embrión y la última permite la descarga del embrión por arrastre.

Una vez armada la pajuela, se carga en una vaina de transferencia azul (imagen 23), ésta presenta una punta atraumática con un orificio lateral por donde se expulsa el embrión. Además, la misma cuenta con una camisa sanitaria plástica (imagen 25 a) que sólo se introduce hasta la porción cervical dando como ventaja mantener la vaina de transferencia libre de contacto con secreciones, exudados vaginales y restos de materia fecal.

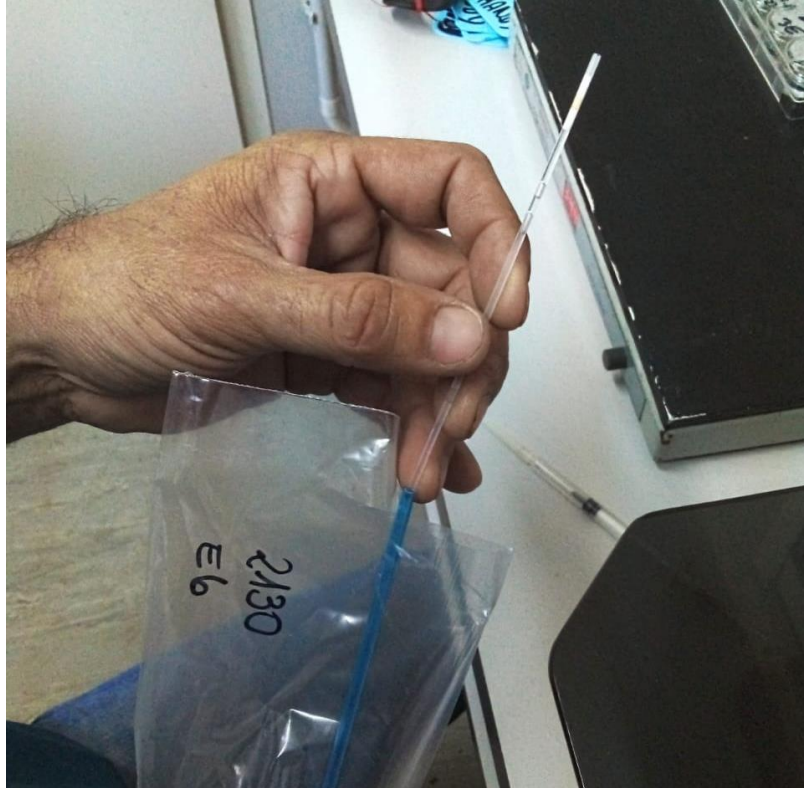


Imagen 23: Acople de pajuela en vaina.

Fuente: Propia.

Por último, la vaina (imagen 25 b) junto con la pajuela se colocan en la pistola de transferencia (imagen 25 c). Una vez armada la vaina de TE se conserva a una temperatura ambiente de 20°C (imagen 24) y cuando se debe trasladar la misma hasta llegar a la vaca receptora se cuida de los cambios de temperatura (Palma G. A., 2008).

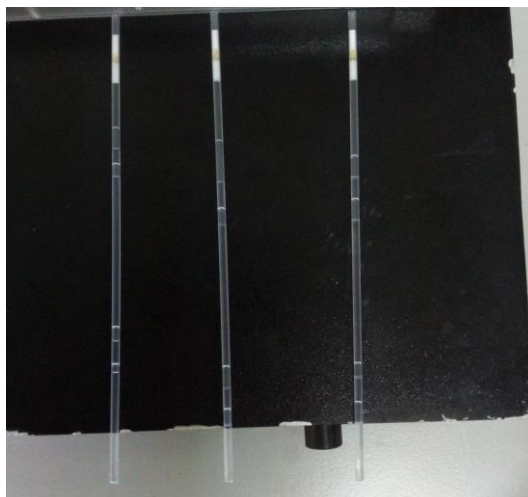


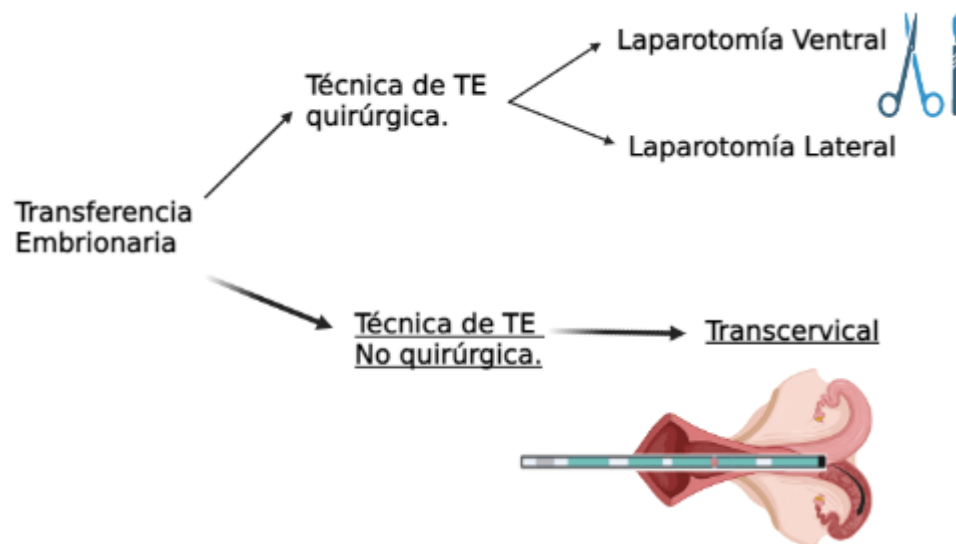
Imagen 24: Pajuelas en platina térmica.

Fuente: Propia

Transferencia embrionaria

Luego de la colecta, búsqueda, acondicionamiento y clasificación se procede a la transferencia embrionaria o a su criopreservación. Los embriones son transferidos entre 1 y 4 horas de finalizada la colecta, pero los mismos pueden ser conservados en estado fresco a temperatura de 22 a 30 °C (ambiente) durante 12 horas sin afectar la viabilidad, teniendo en cuenta que continúan con su proceso de evolución (evidenciado por el cambio de estadio del embrión).

La TE se puede realizar de diversas maneras (esquema 8), actualmente y la que se realiza en este trabajo es la no quirúrgica transcervical.



Esquema 8: Técnicas de TE. Creado con BioRender.com.

La TE en fresco se realiza el mismo día de la colecta. Las hembras receptoras son colocadas en el brete y se les efectúa la palpación rectal para vaciar el mismo y para poder determinar en los ovarios:

- Presencia de CL.
- Ubicación del CL, es decir, en qué ovario se encuentra la estructura.
- Clasificación del CL en los diferentes grados.

La información obtenida de esa palpación es anotada en una planilla junto con los datos de identificación de la hembra receptora.

Se lleva a cabo la anestesia epidural baja (lidocaína al 2% con acepromacina) y limpieza de la región perianal y vulvar de igual manera que en las donantes cuando se realiza la colecta. Después el ayudante de manera manual genera la apertura de los labios vulvares para que la

pistola de TE ingrese directamente al vestíbulo, evitando de esta manera el arrastre de material contaminante (imagen 25).

La técnica es similar a la IA, con la diferencia de que la camisa sanitaria es removida manualmente antes de entrar al cérvix uterino. Luego de atravesar el cuello uterino, se debe enfrenar la pistola de TE al cuerno uterino ipsilateral al CL, es decir del mismo lado de donde se halla el CL. Una vez realizado esto se procede a descargar la pajueta en la mitad del cuerno uterino y de esta manera se deja depositado el embrión.



Imagen 25: Transferencia embrionaria. a. Camisa sanitaria plástica. b. Vaina de TE.
c. Pistola de TE.

Fuente: Propia.

Según lo expuesto por Sreenan y Diskin (1987) (citado por Palma G. A., 2008) el embrión se debe transferir siempre en el cuerno uterino ipsilateral a la ovulación, ya que la transferencia en el cuerno contralateral provoca una alta mortalidad embrionaria debido a que las señales luteotróficas y antiluteolíticas del embrión fallan en alcanzar el CL del lado opuesto a la transferencia.

El procedimiento debe ser realizado con mucho cuidado ya que traumas en el endometrio pueden provocar la liberación de prostaglandinas causando una respuesta inflamatoria, disminución de P4 y aumento de la contractibilidad del útero, esto puede interferir con la vida media del CL y como consecuencia con la sobrevivencia del embrión (Palma G. A., 2008).

Una vaca promedio produce por tratamiento superovulatorio de 10 a 12 ovulaciones con 8 a 10 embriones recuperados, de los cuales 5 a 6 son transferibles y de estos últimos sólo de 3 a 4 terminan en preñez (Bó G. et al., 2011).

Criopreservación

La criopreservación es un proceso de congelación de células, como se mencionó en el apartado de IA las mismas deben ser capaces de sobrevivir a dicho proceso. En este trabajo se desarrolla tanto la criopreservación del semen como la de los embriones de la especie bovina.

Criopreservación del semen bovino

Como primer paso antes de llegar al proceso de congelación, se debe ejercer la elección del macho donante de semen, para esto hay que tener en cuenta una serie de consideraciones:

- Valor zootécnico del macho, el cual se puede determinar con un test de progenie, es decir, conocer la progenie de ese animal.
- Correcta alimentación en su periodo prepuberal.
- Calendarios preventivos contra enfermedades infecto-contagiosas y contra enfermedades parasitarias. Certificado negativo frente a enfermedades predominantes en la región.
- Exámenes clínicos-andrológicos e higiénicos-sanitarios, los cuales constatan de que el macho se encuentra libre de disturbios reproductivos hereditarios o morfofuncionales relacionados al aparato reproductor, como por ejemplo hipoplasia testicular y disfunción del epidídimo.
- La calidad bacteriológica del semen es testigo indirecto de la calidad higiénica del centro de IA y se mide en cantidades de unidades formadoras de colonias (UFC), un buen centro debe tener 500 UFC por ml. Los patógenos que pueden contaminar al semen durante el proceso de congelación son: *Pseudomona areuginosa*, *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, *Escherichia coli*, hongos y levaduras.

Una vez que se ha seleccionado el macho donante, se procede a la preparación del mismo para la recolección del semen. Se recortan los pelos del prepucio, se lava el mismo con solución fisiológica y se seca con papel tissue. Al mismo tiempo se realizan masajes prepuciales para descargar la orina y contribuir a un lavado completo.

Los métodos de extracción utilizados son (Valencia J. et al., 2018):

Vagina artificial.	Electroeyaculador
<p>Es el método de elección para recolección de semen en rumiantes.</p> <p>Consiste en un tubo rígido que contiene una válvula y en el interior se introduce una manga de látex, que se pliega en ambos extremos. La recámara que se forma entre la pared del látex y la pared del tubo se llena con agua caliente a una temperatura de entre 42°C y 45 °C. La obtención del semen se produce cuando el macho monta a una hembra en celo o un potro.</p>	<p>Se utiliza en los machos que no aceptan la vagina artificial.</p> <p>Consiste en la obtención del semen mediante la estimulación de los nervios que controlan el proceso de la erección y de la eyaculación a través de la aplicación de pulsos de electricidad por vía rectal.</p> <p>El eyaculado obtenido mediante esta técnica tiene una menor concentración espermática y un mayor volumen que el obtenido por vagina artificial.</p>

Todas las actividades en el laboratorio se realizan a una temperatura ambiente de 20 °C, con los elementos como portaobjetos y cubreobjetos sobre platina térmica a 35°C. Al igual que los diluyentes y los tubos graduados que se encuentran a la misma temperatura en baño maría. Una vez obtenido el semen, se procede a evaluar las características macroscópicas, microscópicas y las pruebas bioquímicas. Cabe aclarar que cada recipiente (vaso de precipitado, tubo graduado y demás) son adecuadamente identificados con el RP del toro y el número de salto o extracción correspondiente.

Características macroscópicas:

- Volumen: se mide directamente en el tubo graduado que lo contiene. El volumen promedio eyaculado de un macho bovino es de 6 ml (2-10 ml) (Valencia J. et al., 2018).
- Color: del semen es blanco marfil, otros colores pueden indicar alteraciones (presencia de pus, orina o sangre).

- Aspecto: varía dependiendo de la concentración espermática (número de células espermáticas en el eyaculado). El mismo está a su vez relacionado con el método de recolección de semen, si se extrae por electroeyaculador va a ser más lechoso debido a un aumento en el estímulo de las glándulas anexas lo que genera mayor líquido seminal que en un eyaculado obtenido por monta natural. Según Barth (2007) el aspecto se puede clasificar: Muy Bueno = Cremoso, espeso 750.000 espermatozoides (esp)/mm³; Bueno = lechoso, 400 a 750.000 esp/mm³; Regular = leche aguachenta, 250 a 400.000 esp/mm³ y Pobre = traslucido, menos de 250.000 esp/mm (citado por Stornelli M. A. et al., 2016).

Características microscópicas:

- Movimiento en masa: se evalúa la presencia de movimiento en forma de ondas omega, el cual se genera por la combinación de la motilidad y la concentración de los espermatozoides en el eyaculado. Se observa una gota del mismo sin diluir sobre un portaobjeto tibio y sin cubreobjetos en el microscopio con un objetivo de 10X o entre 40 y 125 aumentos, determinando según la escala del 0-4 qué tan bien se forman las ondas: 4 = Muy bueno. Ondas oscuras y de movimiento rápido. 3 = Bueno. Ondas aparentes, movimiento moderado. 2 = Regular. Ondas con movimiento apenas perceptible. 1 = Pobre. No hay ondas, pocas células móviles. 0 = Muy pobre. No hay células móviles. La motilidad masal depende de tres factores que son; la concentración, el porcentaje de movimiento progresivo y la velocidad o vigor de los espermatozoides (Stornelli M. A. et al., 2016).
- Motilidad individual: se expresa como el porcentaje de células móviles bajo un campo microscópico, el valor mínimo aceptable para un toro de rodeo general del 60 % (Stornelli M. A. et al., 2016). Esta se mide colocando una gota de semen diluido entre un porta y un cubreobjetos en un microscopio a 40X o 100X. También la motilidad individual se puede evaluar con el semen sin diluir utilizando una gota de 3 a 4 mm entre un portaobjeto y cubreobjetos limpio, nuevo y atemperado. Se debe observar entre 2 - 3 campos y valorar subjetivamente los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, siendo éstos los que atraviesan el campo de observación.
- Vigor: hace referencia a la motilidad individual, el tipo e intensidad del movimiento de las células espermáticas (Palma G. A., 2008). Se observa de igual forma que el movimiento en masa y se clasifica en una escala de Vigor del 1 al 5: 1- inmóviles; 2- movimientos esporádicos; 3- ondas lentas; 4- ondas rápidas y 5- ondas vigorosas.

- **Concentración espermática:** es la cantidad de espermatozoides en un volumen establecido (mililitros). Para determinar la concentración se puede utilizar la cámara de Neubauer, el espectrofotómetro, el fotocolorímetro, o un contador fotoeléctrico de células (Culter counter). Previo al conteo con uno u otro método se debe diluir el semen en una proporción justa de acuerdo al método elegido. La cámara de Neubauer está formada por dos áreas cuadrículadas, cada una de las cuales cuenta con cinco cuadrantes por lado (25 cuadros grandes), separados entre sí por dos líneas paralelas. Cada cuadrante contiene a su vez 16 cuadros chicos (Valencia J. et al., 2018).

En la evaluación utilizando la cámara de Neubauer, la dilución del semen se realiza en una solución salina formolada al 2% en una proporción de 1/200 (esta solución permite la inmovilización de las células espermáticas). Para preparar la cámara, se deben humedecer los bordes de ésta antes de colocar el cubrecámara. Luego se debe presionar para que ambas partes queden unidas y al invertir la cámara, no se separen. Después se cargan por capilaridad las dos áreas cuadrículadas.

Luego se debe dejar reposar unos minutos para permitir que todos los espermatozoides decanten y se ubiquen en un mismo plano para poder contarlos. El conteo se realiza utilizando un microscopio con una magnificación de 400X. Se cuentan todos los espermatozoides que se estén en las cuatro cuadrículas de las puntas y la central. Se cuentan las dos áreas cuadrículadas y se saca el promedio. (Stornelli M. A. et al., 2016). Para obtener el número de espermatozoides por mililitro es necesario contar ambas áreas cuadrículadas, considerar el factor de dilución, el área de toda la cámara, y el volumen de la misma (Valencia J. et al., 2018). La concentración seminal para un toro de rodeo general no debería ser inferior a 500.000 esp/mm³ (Stornelli M. A. et al., 2016).

- **Coloración vital:** determina el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta a través de la realización de un frotis con una coloración de eosina-nigrosina. El fundamento de esta técnica es determinar la vitalidad del espermatozoide, ya que si el colorante penetra la membrana de los espermatozoides indica que estos presentan su membrana dañada o están muertos (se visualiza un color lila o rosado), mientras que los que quedan sin teñir se encuentran con la membrana celular intacta o vivos al momento de realizar la tinción.

La coloración se realiza colocando una gota de semen puro sobre un portaobjeto (limpio, desengrasado y atemperado) y sobre esa gota se coloca una gota de tinción, se mezcla con la punta de una pipeta, se realiza el extendido y se deja secar sobre una

platina térmica. Luego para determinar el porcentaje de vivos se utiliza un microscopio para observar el frotis con una magnificación de 400X, se cuentan 100 o más células y se saca el porcentaje. Se considera como valor mínimo aceptable 70% de espermatozoides vivos. La lectura se debe hacer el mismo día de la extracción. (Stornelli M. A. et al., 2016).

Con la tinción con eosina-nigrosina además de determinar el porcentaje de espermatozoides vivos se puede evaluar la morfología de la célula espermática (Valencia J. et al., 2018).

- Morfología espermática: el espermatozoide bovino tiene una longitud de entre 68 y 74 μm y está formado por cabeza, cuello, pieza intermedia y cola. La cabeza, en su parte anterior está recubierta por el acrosoma. Por lo cual se evalúa la integridad del acrosoma a través de un frotis teñido con Giemsa. Lo que se observa es la presencia o ausencia del capuchón acrosomal. Si está presente el capuchón se valora su homogeneidad, su forma normal y que no posea vacuolas ni esté tumefacto. El valor mínimo aceptable para animales de rodeo general es de 70% de acrosomas normales (Stornelli M. A. et al., 2016).

Pruebas bioquímicas:

En el caso de los toros, la prueba bioquímica que se realiza de rutina como parte del examen biológico del semen es el pH.

- pH: se evalúa extrayendo una gota de semen del tubo y colocándola sobre una tira indicadora de pH. Se considera un pH normal, entre 6.2 y 6.8 (Stornelli M. A. et al., 2016).

En la actualidad, se encuentran disponibles en el mercado diferentes diluyentes con variaciones en su composición, el mismo debe ser preparado conforme dicte su prospecto y mantenido a una determinada temperatura. El diluyente sobrante se puede congelar (rotular en el envase la fecha de congelación), una vez descongelado no puede volver a congelarse.

La utilidad de los diluyentes es la de incrementar el volumen del eyaculado y proteger a los espermatozoides durante la refrigeración y la congelación. Las propiedades que debe poseer un diluyente ideal son:

- Debe ser isotónico como el semen.
- Debe poseer capacidad buffer, es decir, ser capaz de prevenir los cambios de pH, esto lo logra neutralizando el ácido proveniente del metabolismo de los espermatozoides.
- El diluyente debe proteger a los espermatozoides del shock térmico.

- Debe proveer nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides.
- Debe controlar la contaminación bacteriana (antibióticos).
- Debe proteger al semen durante la congelación y la descongelación.
- Debe preservar la vida del espermatozoide con la mínima pérdida de la fertilidad.

Concluida la evaluación de las características seminales se procede a taponar el semen, agregando la misma cantidad de diluyente que la muestra de semen obtenida. Se prepara en simultáneo un vaso de precipitado con el volumen total de diluyente a utilizar para dicho volumen de muestra, se aguarda 10 minutos a temperatura de laboratorio y pasado este lapso de tiempo, la muestra taponada se vierte en el vaso de precipitado por las paredes del mismo. La tasa de dilución depende de la concentración espermática del eyaculado. En el bovino, la concentración final debe ser de 15 a 20 millones de espermatozoides en 0.25 o 0.5 ml dependiendo de la pajuela en la que se vaya a envasar (Valencia J. et al., 2018).

Luego el semen diluido se lleva a la heladera a una temperatura de 4°C por 4-6 horas para su equilibración. Este proceso hace referencia a un período de 2 a 5 horas durante el cual se establece un intercambio proteico entre el plasma seminal y la célula espermática, que le permite a ésta aumentar su resistencia a la congelación (Stornelli M. A. et al., 2016). Pasado el tiempo de equilibración, la temperatura del laboratorio pasa a ser de 5 - 10°C para comenzar a preparar la máquina llenadora y selladora de pajuelas de 0,5 ml. Una vez obtenida las pajuelas se colocan de manera horizontal dentro de un contenedor (racks).

Completados todos los racks con pajuelas, estos se colocan en una congeladora (freezer biológico) automática durante 9 minutos, en el cual la temperatura desciende de 4°C a -150°C en 3 etapas. Luego las pajuelas son sumergidas de manera directa en el nitrógeno líquido en donde se procede a retirar dos de ellas correspondientes a cada salto por animal, con la finalidad de realizar el Test de Termorresistencia (TTR). El último paso consiste en transferir las pajuelas al termo de nitrógeno para su almacenamiento por tiempo indefinido.

El TTR es una evaluación que se le realiza a las pajuelas luego de su congelación. La misma se basa en descongelar las pajuelas (de la misma forma que la descrita en el apartado de IA) y evaluarlas de manera subjetiva. El TTR evalúa;

- Viabilidad: teniendo en cuenta el porcentaje de motilidad progresiva, grado de motilidad y porcentaje de acrosomas intactos
- Morfología: mínimo 70% normales con no más de 15-20% de defecto de cabeza y no más de 25% de defecto de acrosoma y cola.
- Concentración: lo ideal es 10 millones de células viables por dosis.

El TTR es utilizado como un indicador de la supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra luego de la IA. Por lo que, una vez descongelada la pajuela, se descarga en un tubo graduado atemperado a 35°C y se coloca una gota entre porta y cubreobjetos (atemperados en plantina térmica) para determinar las características seminales microscópicas. El semen contenido en el tubo se deja en baño maría a la misma temperatura y se vuelve a evaluar las mismas características dos horas después. Por último, hechas las observaciones el/la médico/a veterinario/a realiza un juicio de valor en donde se decide si esa partida de pajuelas de un determinado salto es almacenada o se procede a su descarte.

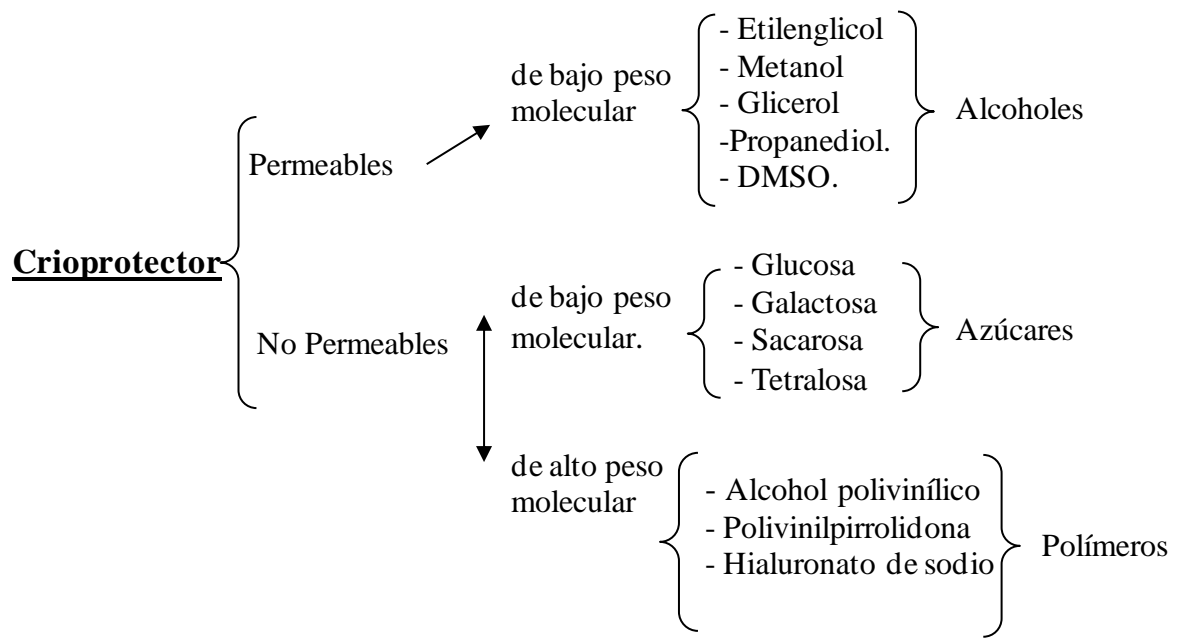
Criopreservación del embrión bovino

La criopreservación posibilita el almacenamiento por un tiempo indeterminado de los embriones de un alto valor genético sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos. Esta tecnología forma parte integral de los programas de transferencia, ya que además de posibilitar el comercio nacional e internacional de reproductores, otorga una mayor flexibilidad en la disponibilidad de las receptoras lo cual permite una planeación más eficiente de las transferencias.

Principio de la criopreservación embrionaria

Según lo expuesto por Schneider y Mazur (1984); Aller y col. (1995) (citado por Palma G. A., 2008) la congelación es un proceso físico-químico complejo, en donde se produce un intercambio entre las células y el medio extracelular de calor y agua, que finaliza en el cambio del estado líquido al sólido. Además tanto la congelación como la descongelación de los embriones son procesos rápidos, para lo cual se necesita una deshidratación parcial de los mismos con el fin de evitar la formación de cristales que dañen a las blastómeras.

La deshidratación parcial se logra a través de la incorporación de un agente crioprotector (CP) al medio de congelación. Los CP se clasifican en permeables y no permeables (esquema 9), en función de su capacidad para penetrar en el interior de las células a temperaturas cercanas a 0°C.



Esquema 9: Clasificación de los crioprotectores. BioRender.com

Los CP permeables penetran a las células reemplazando a las moléculas de agua, lo que tiene como consecuencia una reducción en la formación de cristales de hielo durante la congelación. Los CP se solidifican al congelarse formando una sustancia amorfa de consistencia vidriosa.

Los CP no permeables actúan generando diferencias de presión osmótica desde el exterior de la célula lo que favorece su deshidratación reduciendo la probabilidad de formación de hielo intracelular (Balcázar A. S. et al., 2018). A su vez los CP no permeables de bajo peso molecular para proteger efectivamente a las células embrionarias durante la congelación deben ser combinados con CP permeables (Bó G. et al., 2011).

Cada uno de los CP tiene su propio mecanismo de acción, la generalidad de sus efectos es: estabilizar las membranas celulares, producir la salida de agua intracelular y reducir la concentración de electrolitos del medio extracelular.

Para sobrevivir al proceso de criopreservación las células deben permanecer sin daño y fisiológicamente funcionales. Cuando el embrión se expone al CP inicialmente se encoge debido a la pérdida de agua a causa de la hiperosmolaridad de la solución extracelular, esto finaliza cuando se establece un balance entre los flujos de agua y CP. En este trabajo se utiliza

el CP de etilenglicol (EG) el cual demora entre 5-10 minutos en ingresar a las células y provocar nuevamente el aumento de tamaño del embrión hasta llegar a su volumen original (punto de equilibrio).

El día de la colecta, luego de la clasificación embrionaria, se procede a realizar la criopreservación de embriones. Los únicos sometidos a dicho proceso son los de calidad excelente a buenos. El procedimiento para la criopreservación de embriones bovinos incluye los siguientes pasos:

1. Los embriones son expuestos a una solución que contiene EG a una concentración de 1.5 M, a temperatura ambiente (22 °C), hasta que se alcanza el punto de equilibrio. La duración de este periodo es de 5-10 minutos (este tiempo depende del CP utilizado).

2. Durante el periodo de equilibrio los embriones son colocados en pajuelas de 0,25 ml de color amarilla (imagen 26). Una vez armadas (de igual forma a la explicada en el apartado “armado de pajuela”), se coloca en el extremo donde se encuentra el algodón un identificador de plástico (imagen 27), el cual presenta los datos de: código de la raza, el número o apodo de la donante y el toro, código de la IETS correspondiente al técnico, fecha de procesamiento, número de pajuela, cantidad de embriones, código de estadio y calidad del embrión.

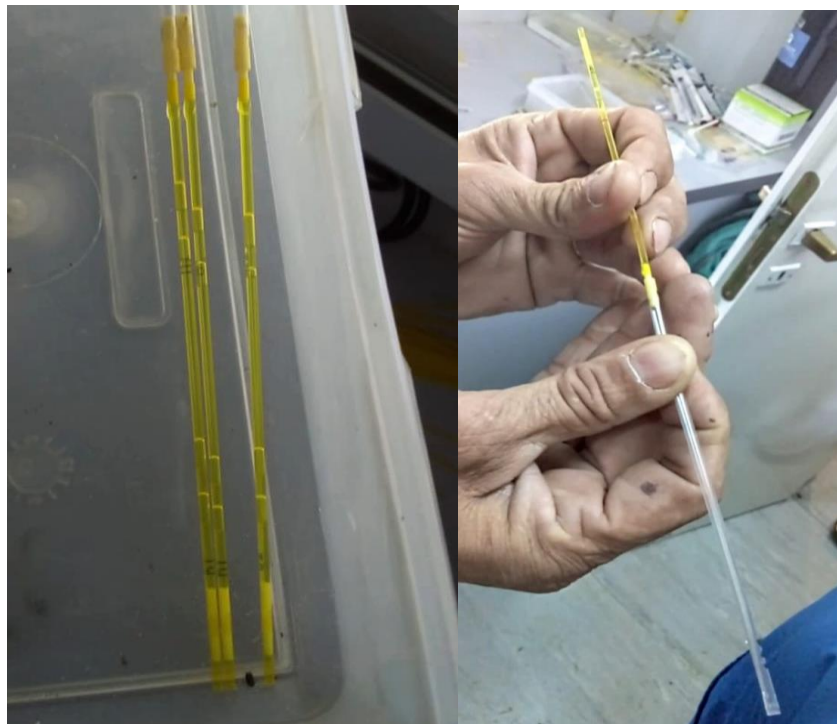


Imagen 26: Pajuelas amarillas cargadas. **Imagen 27:** Acople de pajuela con su indicador.

Fuente: Propia.

3. Luego las pajuelas para bajar su temperatura son sumergidas en un congelador programable, el cual contiene metanol a -6°C (imagen 28 y 29). Luego de un minuto se realiza el *seeding* y se deja a -6°C durante un período de reequilibración de 15 minutos.



Imagen 28: Congelador programable con metanol. **Imagen 29:** Pajuelas de TE sumergidas en metanol.

Fuente: Propia.

El *seeding* consiste en tocar la pajuela con una espátula que se encuentra sumergida en nitrógeno líquido (imagen 30). El sitio de contacto está por debajo del tapón de algodón o entre medio de las dos primeras burbujas de aire. La finalidad de este procedimiento es inducir la formación de cristales de hielo en el medio extracelular que rodea al embrión, para evitar cambios de temperatura locales que puedan resultar perjudiciales para el mismo (imagen 31).

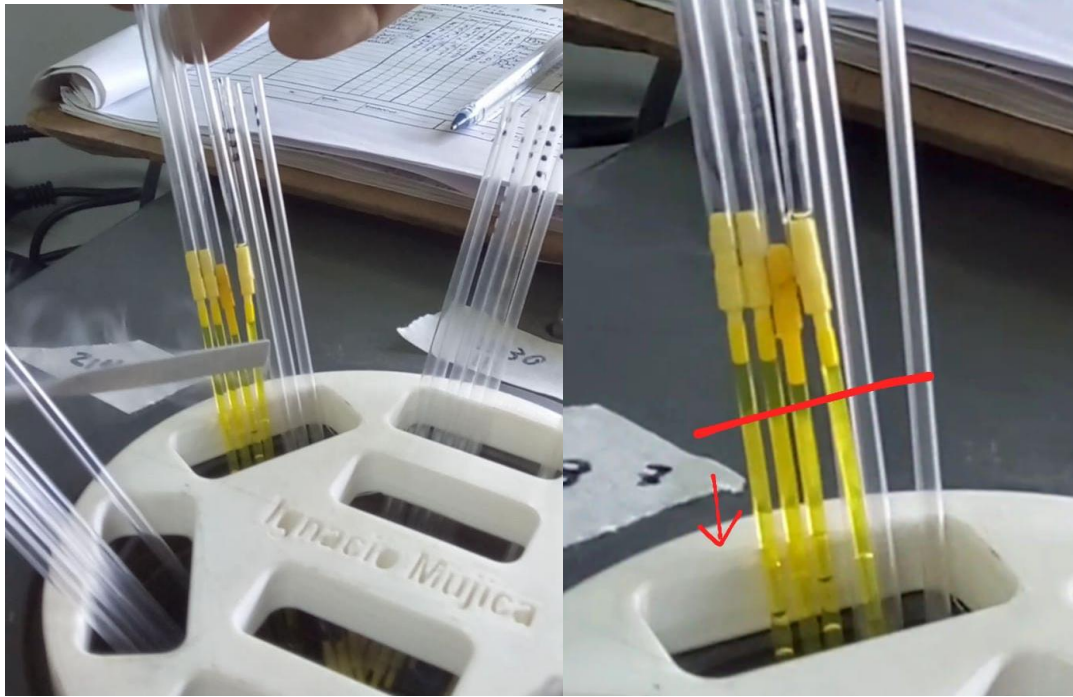


Imagen 30: Realización del *seeding*. **Imagen 31:** Inicio de la formación de columna de hielo.

Fuente: Propia.

4. Después se continúa con el descenso lento y controlado de la temperatura. La curva de enfriamiento utilizada fue desde -6°C hasta -35°C descendiendo a -0.5°C por minuto.

5. Una vez que se arriba a la temperatura deseada se colocan las pajuelas en nitrógeno líquido a -196°C .

En la exportación de embriones y a pedido del país importador, los embriones deben ser lavados con tripsina como tratamiento profiláctico de la transmisión de enfermedades virales (IBR y Estomatitis vesicular). Los embriones son lavados dos veces en PBS sin calcio y sin magnesio con 0.4% de BSA y antibióticos. Luego son expuestos a una solución de tripsina en solución de Hanks al 0.25 durante 60 a 90 segundos en dos pasajes sucesivos. Finalmente son lavados seis veces en PBS con 10% suero fetal bovino más antibióticos.

Consideraciones finales

Para concluir con este trabajo final, las biotecnologías en el ganado bovino desarrolladas no son prácticas habituales realizadas en la Patagonia, por lo que este trabajo busca una difusión de la IA y TE con sus métodos y resultados.

La implementación de estas biotecnologías en la Patagonia, en un futuro, ayudará a aumentar el valor genético de los animales que residen en esta región, así como también disminuir el riesgo de enfermedades y adaptar ciertas razas a las condiciones climáticas que predominan en este territorio. A su vez, este avance genético permitirá obtener un producto de mayor calidad y valor que la media lo que posibilita que la Patagonia continúe creciendo tanto a nivel nacional como internacional.

Es pertinente que antes de iniciar con un protocolo de IATF y/o TETF sea necesario detectar los factores que más perjudican la eficiencia reproductiva de la hembra bovina y que los mismos se encuentren controlados o equilibrados, como por ejemplo: el manejo, la nutrición, las condiciones ambientales, la sanidad, la infraestructura y los programas de reproducción utilizados y dentro de éstos la correcta implementación de programas de IA y la calidad del semen a utilizar. Si alguno de los factores antes mencionados se encuentra descontrolado podría afectar negativamente los parámetros reproductivos, por lo que si se implementara alguna práctica biotecnológica en estas condiciones los resultados a obtener no serán los mejores.

Otro punto de importancia es que en el mercado se encuentra a disposición un gran abanico de fármacos que se pueden utilizar en diferentes protocolos de IA y TE, el de elección en estas prácticas realizadas es la combinación de E2 con P4. En la actualidad el E2 tiene una aplicación restringida en varios países debido a la posibilidad de que se acumulen residuos de éste en la carne, poniendo en riesgo la salud del consumidor. La Unión Europea (UE), mediante la Directiva 96/22/CE del Consejo de 29 de abril de 1996 y sus modificatorias, prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal, tirostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado. Dicho esto, la UE prohíbe la importación de animales, carne o productos de origen animal de terceros países que permitan la administración de “17 β estradiol” y sus ésteres para la cría de ganado en vistas de sus posibles riesgos para la salud humana.

Por lo que la Republica Argentina, mediante las Resoluciones números 447 del 16 de abril de 2004 y 148 del 5 de abril de 2006 de la ex-SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTOS prohíbe en todo el Territorio Nacional el uso de las sustancias de efecto hormonal, tirostático y sustancias β -agonistas, siendo equivalentes a la Directiva Europea.

Para poder cumplimentar con estos requisitos, es necesario que los propietarios de los establecimientos registrados como Establecimientos Rurales Proveedores de Ganado para Faena Exportación con destino a la UE y Establecimientos Pecuarios de Engorde a Corral proveedores de bovinos para faena con destino a exportación, requieran de sus proveedores de

bovinos y bubalinos de las categorías vacas y vaquillonas, el compromiso y la declaración expresa respecto a que dichos animales no han sido tratados con productos veterinarios que contengan “17 β estradiol” y sus ésteres, a fin de que estos animales puedan ser destinados a la provisión de carne con destino al mercado de la UE.

Previo a la ejecución de los protocolos de IATF y TETF se debe contar con planillas operativas y de fácil comprensión, las cuales otorguen prolijidad y ordenamiento cronológico de las tareas a realizar ya que se trabaja con mucha cantidad de hembras. Para la realización de estas prácticas se cuenta con planillas para:

- Protocolo hormonal, tanto para donantes como para receptoras.
- IA, donde se designa el toro que se utiliza para determinada hembra donante.
- Detección de celo en receptoras.
- Transferencia embrionaria, la misma presenta información de la hembra donante del embrión y la receptora que recibe al mismo. Clasificación del embrión. Clasificación y ubicación del CL.
- Criopreservación seminal, donde se deja plasmado el RP del toro donante, el número de salto, las características tanto macroscópicas como microscópicas del semen y el test de termorresistencia.

Otro punto de relevancia previo es la selección de las hembras, ya sea donantes como receptoras. Los criterios de dicha selección deben ser correctamente aplicados ya que aseguran el éxito del programa y de esta manera se obtendrán buenos resultados reduciendo los costos de la aplicación de dichas biotecnologías.

En la ejecución de las técnicas propiamente dichas se debe poner mayor atención en la higiene de la zona perianal, así como también en los elementos a utilizar para evitar el arrastre de materia fecal al interior del aparato reproductor femenino, lo cual puede ser responsable de que se origine un proceso infeccioso. Al igual que se deben realizar estas actividades con la mayor delicadeza posible para evitar daños en las paredes uterinas y posteriores reacciones inflamatorias.

Otro asunto a considerar es la clasificación de embriones la cual es subjetiva, sin embargo hay parámetros a seguir que sirven de guía para obtener una clasificación cercana a la exactitud. Dicha clasificación determina el destino de ese embrión, si va hacer criopreservado se debe poner atención al crioprotector a utilizar.

Un punto no menos importante es la elección del CP ya que de acuerdo a su permeabilidad se debe remover o no del embrión porque el mismo puede resultar tóxico. En este trabajo el CP empleado es el etilenglicol el cual no necesita ser removido del interior del

embrión antes de ser transferido debido a que es un agente sumamente permeable, lo cual favorece su eliminación en corto tiempo durante la descongelación disminuyendo sus efectos tóxicos sobre el embrión.

La congelación de embriones presenta un número considerable de ventajas sobre el uso de embriones frescos. Estas ventajas son la criopreservación del sobrante de embriones sobre receptoras disponibles; TE simultánea de diferentes combinaciones de padres aún de la misma donante producidos en diferente fecha; manejo de las fechas de parición ya que los nacimientos se pueden programar en base al manejo del establecimiento; reducción del número de receptoras, debido a que los embriones congelados esperan en el termo de nitrógeno mientras se ejecutan los protocolos de sincronización de las mismas y la criopreservación para la venta.

No obstante, durante los procedimientos de criopreservación de embriones muchos de ellos mueren dando un índice de preñez 10% inferior comparado con los embriones frescos de igual calidad.

Por último, el éxito en la implementación de estas biotecnologías no se debe a un factor en particular, sino que es un conjunto de factores que influyen y determinan en el resultado final, el cual es la obtención de un ternero vivo y sano.

Referencias bibliográficas

- Atuesta, J., & Diaz, A. G. (2011). *Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos*. *Spei Domus*, 16.
- Boeta, M, Balcázar S. A, Cerbón J. L, Hernández Medrano J. H., Hernández Cerón J., Páramo Ramírez R. M., Porras Almeraya A. I., Rangel L., Salgado B., Valencia J. y Zarco L. (2018). *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. (1ª edición.) México. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 12, 105-107, 123, 132-145, 267-269, 275-276, 331, 342.
- Bó G., Mapletoft R. y Tríbulo H. (2011). *Transferencia de embriones y nuevas tecnologías*. IRAC. Córdoba, Argentina. 1-17, 25-28, 55-62, 71-72, 80-84, 93, 112, 115.
- Bustillo Parrado J. C. y Melo Colina J. A. (2020). *Parámetros reproductivos y eficiencia reproductiva en ganado bovino*. 3.
- Cedeño, J. A. V. (2017). *Efecto del celo y el tratamiento con GnRH sobre la tasa de concepción en programas de inseminación artificial y transferencia de embriones bovinos*. (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Córdoba), 2, 12.
- Colazo, M. G., & Mapletoft, R. (2017). *Fisiología del ciclo estral bovino*. *Ciencia Veterinaria*, 16(2), 31-35, 54.
- Cueto M., Gibbons A., Bruno-Galarraga M. M., y Fernández J. (2016). *Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino*. (2ª ed.). INTA ediciones, 15.
- Cutaia, L. E. (2006). *Programas de inseminación artificial a tiempo fijo: análisis de costos e implementación*. Sitio Argentina de Producción Animal, 8
- DeJarnette, M., & Nebel, R. (2004). *Inseminación artificial en bovinos*. Selectreproductive. USA, 3.
- Delgado, P. A. M., Cuélla, N. R., Sánchez, C. M. G., & Rojas, E. C. C. (2011). *Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina*. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 5(2), 89-90.
- Duica, A., Tovío, N., & Grajales, H. (2007). *Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos*. *Revista de Medicina Veterinaria*, (14), 110, 114, 116, 227.
- Iñiguez Montejano, A. L. (2019). *Uso de dos fuentes de estrógenos: benzoato de estradiol vs cipionato de estradiol para sincronizar el estro y la ovulación en vacas holstein-friesian* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

- Jurado Roa, N. D. (2020). *Factores determinantes de la eficiencia reproductiva en bovinos*. 4.
- Klich, Maria, Guadalupe. (2017). *Bases Agropecuarias*. (1ª edición). Viedma. UNRN, 128-130, 155-159.
- Lozano, H. (2009). *Factores que afectan la calidad seminal en toros*. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 56(III), 264-265.
- Manual de la IETS. Manual De La Sociedad Internacional De Transferencia De Embriones. Sección IV. *Manipulación de embriones recolectados para la transferencia comercial*. de http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_16_iets.pdf
- Martínez R. D., Carpinetti B. N., Moreno L. R., & Solis R. (2020). *El ganado bovino criollo patagónico de Argentina*. Latin American Archives of Animal Production, 28(3-4), 54.
- Munar C. J. *Manual de procedimientos MOET. Dos décadas de transferencias embrionarias en bovinos y nuevas biotecnologías disponibles para el futuro*. MUNAR y Asociados S.A. Centro Biotecnológico de Reproducción Bovina Transferencias Embrionaria, 7.
- Nebel, R., & DeJarnette, M. (2011). *Anatomía y fisiología de la reproducción bovina*. SELECT SIRES INC, 1-3.
- Palma G. A. (2008) *Biotecnología de la reproducción*. (2ª ed.) Mar del Plata. Reprobiotec, 4, 156-182, 209, 231-239, 247-249, 253-254, 260, 272.
- Sarmiento Estupiñán, J. A. (2013). *Efecto del ciproionato y el benzoato de estradiol utilizados en un protocolo de sincronización sobre la preñez en novillas receptoras de embriones*.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria-SENASA. “*Fiebre Aftosa. Estatus sanitario de la Argentina para Fiebre Aftosa*”, de <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/bovinos-y-bubalinos-produccion-primaria/fiebre-aftosa>
- Stornelli M. A., y Luzbel de la Sota R. (2016). *Manual de reproducción de animales de producción y de compañía*. (1ª edición). La Plata. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. Edulp, 490.
- Uffo O. (2011). *Producción animal y tecnologías pecuarias: nuevos retos*. Revista de Salud Animal, 33(1), 08-14.
- Vier Sofia. (2018). “*Patagonia Argentina: historia, características, clima, turismo y más*” <https://hablemosdeargentina.com/c-zona-austral/patagonia-argentina/>