

**Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Técnicas Reproductivas en Ovinos:
Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones en la
Empresa OVITEC, Punta Arenas, Chile**

Modalidad: Pasantía

**Trabajo final de graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Gabriela Pérez Molina

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2012

APROBACIÓN DEL COMITÉ ASESOR Y EXAMINADOR

Técnicas Reproductivas en Ovinos:
Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones en la Empresa OVITEC,
Punta Arenas, Chile

Dr. Rafael Vindas Bolaños

Vicedecano de la Facultad de Ciencias de la Salud

Dra. Laura Castro Ramírez

Directora Escuela de Medicina Veterinaria

Dr. Danilo Montero Caballero

Tutor

Dra. Laura Castro Ramírez

Lectora

Dra. Sandra Estrada König

Lectora

DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada a mi mamá, una mujer excepcional,

que me enseña cada día el verdadero sentido del esfuerzo,

de la búsqueda de la felicidad,

del soñar,

del reír y,

en fin,

de la vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios.

A mi familia: papás, hermanos, abuelos, tíos y primos.

Mi abuelo, Bebo

por heredarme la pasión por mi carrera.

Mi mamá

por su amor incondicional,

apoyo inmensurable,

y eterna paciencia.

Demás seres queridos: amigos y profesores.

Por último, pero no menos importante, a toda la gente de Ovitec; que no solo me guiaron y enseñaron sino que me hicieron sentir como en casa, una más del equipo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
TRIBUNAL EXAMINADOR.....	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	5
1.3. Objetivos.....	7
1.3.1. <u>Objetivo general</u>	7
1.3.2. <u>Objetivos específicos</u>	8
2. METODOLOGÍA	9
2.1. Materiales y Métodos.....	9
2.1.1. <u>Área de Trabajo</u>	9
2.1.2. <u>Sistema de producción y registro de las fincas</u>	10
2.1.3. <u>Cronograma y Horario de Trabajo</u>	10
2.1.4. <u>Registro de Datos</u>	11
2.2. Animales	11
2.3. Manejo y abordaje de los machos	11

2.3.1. <u>Selección de carneros</u>	11
2.3.2. <u>Entrenamiento de carneros</u>	12
2.3.3. <u>Repartición de carneros</u>	13
2.3.4. <u>Careros marcadores (Retajos)</u>	14
2.4. Manejo y abordaje de las hembras	15
2.4.1. <u>Condición de las hembras</u>	15
2.4.2. <u>Técnicas reproductivas</u>	15
2.4.2.1. <i>Inseminación Artificial Intracervical con Semen Fresco</i>	15
2.4.2.2. <i>Inseminación Artificial por Laparoscopia con semen congelado</i>	25
2.4.2.3. <i>Transferecia de Embriones</i>	31
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1. Detección de celos	40
3.2. Protocolo de Sincronización de celos	41
3.2.1. <u>Progestágenos</u>	43
3.2.2. <u>Prostaglandinas</u>	45
3.3. Técnicas Reproductivas Asistidas	46
3.3.1. <u>Inseminación Artificial Intracervical</u>	47
3.3.2. <u>Inseminación Artificial por Laparoscopia</u>	53
3.3.3. <u>Transferencia de Embriones</u>	54
4. CONCLUSIONES	63
5. RECOMENDACIONES	64
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7. ANEXOS	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sistema de calificación según movimiento en masa.....	20
Cuadro 2. Concentración de semen según su consistencia.....	21
Cuadro 3. Ventajas y desventajas de utilización de celos naturales contra sincronización de celos.	41
Cuadro 4. Ventajas y desventajas de los protocolos de sincronización de celos utilizando progestágenos contra prostaglandinas	43
Cuadro 5. Resumen de porcentajes de preñez obtenidos como resultados de las TRA ..	47
Cuadro 6. Volúmenes recomendados para la inseminación según la técnica	51
Cuadro 7. Diluciones	52
Cuadro 8. Comparación bibliográfica de porcentajes de preñez obtenidos con IAC	53
Cuadro 9. Comparación bibliográfica de porcentajes de preñez obtenidos con IAL.....	54
Cuadro 10. Factores que intervienen en respuesta a OVM	56
Cuadro 11. Desarrollo embrionario según retiro de esponja.....	57
Cuadro 12. Comparación bibliográfica de porcentajes de preñez obtenidos con TE	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de carne ovina de Chile para el período 2004-2011.....	3
Figura 2. Punta Arenas, Chile.....	9
Figura 3. Selección de carneros	13
Figura 4. Entrenamiento de carneros	13
Figura 5. Carneros marcadores con arneses	14
Figura 6. Reacomodo de arnés diario	15
Figura 7. Reacomodo de arnés diario	15
Figura 8. Esquema de protocolo de IAC en Punta Delgada	16
Figura 9. Limpieza de prepucio	18
Figura 10. Extracción de semen.....	18
Figura 11. Leche descremada en baño maría a 30°C.....	22
Figura 12. Pistola de inseminación	23
Figura 13. Cérvix observado con vaginoscopio	25
Figura 14. Inseminación Artificial Intracervical	25
Figura 15. Esquema de protocolo de IAL.....	26
Figura 16. Camillas de volteo	27
Figura 17. Sujeción de ovejas para IAL	28
Figura 18. Sujeción de ovejas para IAL	28
Figura 19. Inyector unido a jeringa de 1.0 ml.....	29
Figura 20. Dosis de semen.....	29
Figura 21. Esquema de protocolo de TE	32
Figura 22. Útero expuesto.....	35
Figura 23. Pinza hemostática en base de cuerno uterino	35

Figura 24. Ilustración de lavado de un cuerno uterino	36
Figura 25. Búsqueda de embriones.....	37
Figura 26. Embriones sobre plantilla térmica.....	37
Figura 27. Manipulación de cuernos para observar respuesta ovulatoria	39
Figura 28. Esponja	45
Figura 29. Control Interno de Liberacion de Droga	45
Figura 30. Instalaciones adecuadas.....	50
Figura 31. Instalaciones adecuadas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

CIDR: control interno de liberación de droga

CL: cuerpo lúteo

eCG: gonadotropina coriónica equina

EPZ: espermatozoides

FSH: hormona folículo estimulante

IA: inseminación artificial

IAC: inseminación artificial intracervical

IAL: inseminación artificial por laparoscopia

IAU: inseminación intrauterina

IAV: inseminación artificial intravaginal

IATF: inseminación artificial a tiempo fijo

MN: monta natural

MPM: Merino Multipropósito

LH: hormona luteinizante

OVM: ovulación múltiple

P₄: progesterona

Pg: prostaglandina

PgF₂ α : prostaglandina F 2 *alfa*

TE: transferencia de embriones

TRA: técnicas reproductivas asistidas

VA: vagina artificial

ZP: zona pelúcida

RESUMEN

El presente trabajo describe las principales técnicas aplicadas en la reproducción ovina en la región de la Patagonia chilena. La pasantía fue realizada con la empresa chilena OVITEC, con sede en Punta Arenas, Chile, que usa estos procedimientos modernos para mejorar la genética del hato ovino nacional chileno. Su duración fue de 10 semanas, entre el 25 de abril y el 30 de junio de 2011. El trabajo consistió principalmente de giras a campo, donde se pusieron en práctica tres diferentes técnicas reproductivas en la especie ovina: Inseminación Artificial Intracervical (IAC) con semen fresco, Inseminación Artificial por Laparoscopia (IAL) con semen congelado y Transferencia de embriones (TE). Más de 30 mil animales fueron sometidos a la técnica intracervical, alrededor de 309 a laparoscopia y 205 a transferencia de embriones.

Dentro de las actividades realizadas se encuentran el montaje de laboratorios, entrenamiento de 38 carneros reproductores y su extracción de semen, dilución de semen, sincronización y detección de celos en 30,918 hembras, preparaciones quirúrgicas, anestesias y desarrollo de las técnicas propiamente dichas: 30,404 inseminaciones intracervicales, 309 inseminaciones por laparoscopia, 24 lavados uterinos y 205 transferencias de embriones.

Los porcentajes de preñez obtenidos fueron 82,9% para IAC, 79,3% para IAL y 72,2% para TE. En el texto se detallan la discusión pertinente apoyada con datos bibliográficos, las conclusiones de su uso y recomendaciones para mejorías a nivel nacional.

ABSTRACT

The present report describes the main assisted technologies applied to ovine reproduction in the region of the Chilean Patagonia. The externship was developed with the Chilean company OVITEC, located in Punta Arenas, Chile, which uses these modern techniques for genetic improvement in the national Chilean flock. Its duration was 10 weeks, from April 25th to June 30th, 2011. The study involved mainly field trips, where these reproductive techniques were applied in sheep: Intracervical Artificial Insemination with fresh semen, Laparoscopic Artificial Insemination with frozen semen and Embryo Transfer. More than 30 thousand animals were subjected to intracervical technique, 309 to laparoscopy and 205 to embryo transfer.

Part of the developed activities were: lab set up, 38 ram training and their semen extraction, semen dilution, estrus synchronization and detection in 30,918 ewes, surgical preparations, anesthesia and the techniques *per se*: 30,404 intracervical inseminations, 309 laparoscopic inseminations, 24 flushes and 205 embryo transfers.

The pregnancy rates obtained were 82.9% for intracervical, 79.3% for laparoscopy and 72.2% for embryo transfer. In this paper the results discussion, conclusions and recommendations for possible use under local (Costa Rican) conditions are detailed.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

En los últimos veinte años la reproducción animal se ha revolucionado gracias al uso de nuevas tecnologías. Se denominan técnicas reproductivas asistidas (TRA) y se utilizan principalmente para el mejoramiento genético, que a largo plazo contribuyen a aumentar la producción y rentabilidad de las explotaciones ganaderas (Grazul-Bilska, 2010).

La inseminación artificial (IA), sincronización e inducción de celos, sincronización de partos, fertilización *in vitro*, transferencia de embriones con superovulación, sexado de embriones y de semen y la transgénesis, son las principales TRA utilizadas actualmente (Youngquist & Threlfall, 2007; Grazul-Bilska, 2010).

Es importante tener presente que las ovejas presentan, en áreas de clima templado, estacionalidad reproductiva. Se ha establecido que su determinante principal es el fotoperiodo, mientras que existen muchos otros factores que solamente la modulan, como lo son: el establecimiento de jerarquías, la calidad nutricional, la temperatura del ambiente y el periodo de lactación; es decir, estos solo pueden influenciar el inicio y la duración del periodo de anestro. En áreas tropicales la calidad nutricional es el único responsable de alguna manifestación de anestro (Rosa & Bryant, 2003).

La población mundial ovina para el 2006 rondaba los 416 millones y para el año 2011 supera a los 1000 millones (FAO, 2011). En el mismo informe se menciona que como especie, los ovinos poseen el mayor número de razas registradas: 25% del total de razas registradas de mamíferos y las TRA están jugando un papel cada vez más importante en su producción y manejo (Alexander *et al.*, 2010). Por ejemplo, desde principios de los años 50, se empezaron a

utilizar terapias hormonales para superar la estacionalidad, lo cual permitió el inicio de explotaciones basadas únicamente en la especie ovina, donde anteriormente se utilizaban solamente como complemento en las producciones de otras especies (Gordon, 2005). Ahora bien, según Porras y colaboradores (2003) queda claro que las razas ovinas de latitudes extremas presentan una marcada estacionalidad reproductiva, pero en el caso de las razas adaptadas a vivir en el trópico se considera que no presentan anestro estacional verdadero, por lo que las terapias hormonales no se utilizan para sacar a los animales del anestro sino más bien para sincronizarlos y llevar a cabo Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) o manipulación de embriones.

En el 2007 se publica en el periódico digital El Financiero, en la sección de Economía y Política, un artículo sobre la producción ovina en Costa Rica, que menciona que el consumidor costarricense demanda cada vez más carne de cordero y que el precio es mucho menor en cortes nacionales que en los cortes importados. Asimismo, el crecimiento de turistas en nuestro país, sumado a que países como México no logran saciar su propia demanda, nos abren las puertas a la exportación de productos de origen ovino. Se recalca que el reto inmediato de la Cámara Costarricense de Productores de Ovinos es crecer en cantidad de producción, a la vez que se realiza mejoramiento genético para tener mejor calidad de productos, que permitan la competencia a nivel internacional (Fernández, 2007).

Producción Ovina en Chile

La Producción ovina en Chile es bastante estable y tiene como principales productos la carne y la lana; los sistemas lecheros con ovejas son incipientes. En el año 2010 se produjeron alrededor de 10 500 TM de carne en canal, a partir de 765 mil ovinos sacrificados

(peso promedio de la canal de 14 kg). La producción de lana fue en ese mismo año de 7 808 TM (ODEPA-INE, 2010).

Este país exporta aproximadamente el 50% de la producción de carne ovina, con destino principalmente a la Unión Europea, generando ingresos de entre 20 y 30 millones de dólares por año. El consumo per cápita chileno oscila entre 0.2 y 0.4 kg/habitante/año (ODEPA, 2010), cifra muy marginal si se compara con los 23 kg de Nueva Zelanda, 13 de Australia y entre 10 y 15 de los países árabes petroleros (FAOSTATS, 2010). En América Latina, Uruguay es el país que muestra un mayor consumo (6 kg/persona/año).

La Figura 1 muestra la distribución de la producción de carne de Chile para el período 2004-2011. Existe una marcada estacionalidad de la producción de carne, en los meses de verano/primavera (de diciembre a mayo). Ello es producto de las condiciones climáticas, que generan por un lado una estacionalidad en la producción de los forrajes, y por otro lado el efecto directo en la reproducción de los ovinos.

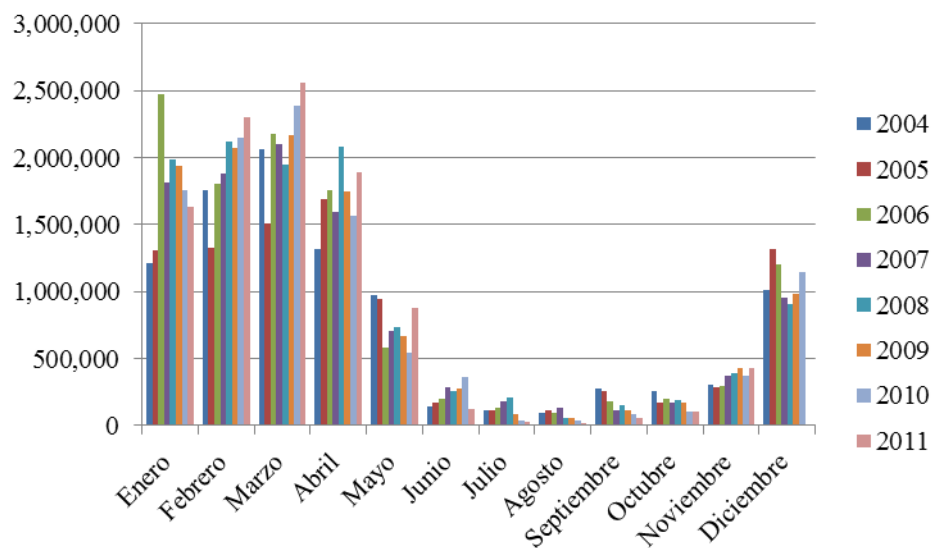


Figura 1. Producción de carne ovina de Chile para el período 2004-2011.
(www.odepa.cl/jsp/sesa/sesa_eBnf.EC.jsp)

La producción ovina está muy concentrada en la XII Región (provincias de Magallanes y Antártida), que fue la zona donde se hizo el presente trabajo. En esta Región se encuentra el 77% del inventario total de país. Los sistemas de producción están basados en el pastoreo extensivo (menos de un ovino por hectárea) sobre praderas naturales. Las razas más abundantes son la Corriedale (60%), Suffolk (8%), Merino (5%) y sus cruza. Las explotaciones tienden a ser grandes (más de 1000 ovinos por finca) y las pariciones se concentran usualmente en un período de 2 meses. Datos censales muestran que solo el 17% de las explotaciones usan inseminación artificial en la XII Región (ODEPA-INE, 2010).

Un análisis reciente del agro-negocio ovino de Magallanes indica que tanto los porcentajes de destete como la tasa de extracción (ovinos sacrificados/inventario) son bajos al compararlos con competidores a nivel mundial, como lo son Australia y Nueva Zelanda. El porcentaje de destete es de 74% y la tasa de extracción es de menos del 25%, mientras que en Oceanía los destetes superan el 100% y la tasa de extracción está por encima del 50%. Se indica que el principal problema de Magallanes no es la fertilidad de las ovejas, sino la alta mortalidad de corderos. Se ha planeado por ello un programa de mejora de la alimentación de las ovejas vía praderas, de manera que se disminuya la mortalidad de sus crías (Álvarez, 2010).

Existe poca información sobre las causas de mortalidad de ovinos en Chile. Una encuesta a más de 2 mil productores reveló que las principales causas de mortalidad de corderos menores de 5 días fueron los depredadores (zorros, perros y aves de rapiña), el clima y la condición de las madres (ODEPA-INE, 2010).

1.2. Justificación

La única técnica de IA que ha arrojado resultados de preñez aceptables con la utilización de semen congelado, es la que se realiza de manera intrauterina, a diferencia de la intravaginal o intracervical. Otras especies domésticas como la vaca y la cabra, no presentan mayores complicaciones a la hora de realizar dicho procedimiento de manera transcervical (con pipeta de inseminación), siendo esta última mucho más sencilla y económica. El caso de la oveja es muy diferente; la técnica transcervical no es viable, ya que presenta un cérvix mucho más pequeño y estrecho, compuesto por varios anillos irregulares en forma de embudo, que ni aun en periodo de celo hay garantía de que sea posible de travesar con pipeta de inseminación (Mckusick *et al.*, 1998).

Aun así, dentro de los beneficios que brinda un programa de IA se encuentran: mejoramiento genético, con disminución en la necesidad de presión de selección sobre los machos del establecimiento; adquisición de genética de machos superiores a los que solo se les puede acceder mediante la compra de semen, ya que pertenecen, en su mayoría, a centros de inseminación en otros países. Además cualquier productor, sin importar el tamaño de su explotación, puede tener acceso a los mejores machos, facilidad de manejo y transporte a nivel nacional o internacional de las pajillas de semen y control de enfermedades mediante el uso de machos con certificación de ser libres de enfermedades (Youngquist & Threlfall, 2007; Leethongdee, 2009).

Autores australianos reportaron en 1979, que la inseminación artificial con semen fresco vía laparotomía medio ventral resultó en altos porcentajes de fertilización intrauterina (Salamon *et al.*, 1979). Estos datos muestran que el problema de bajos porcentajes de preñez

con semen refrigerado o congelado vía cervical se pueden evitar si se deposita el semen directamente dentro del útero, además de que se necesita menos cantidad (Gordon, 2004). Killeen y Caffrey (1982) reportaron un alto porcentaje de fertilización utilizando tanto semen fresco como descongelado, con la ayuda del laparoscopio.

Un estudio chileno arrojó un porcentaje de fertilización significativamente mayor en ovejas inseminadas unilateralmente con semen fresco comparado con inseminación intracervical (84% versus 19%) (Correa *et al.*, 1994). La forma más practicada de inseminación intrauterina en ovejas es la laparoscópica (IAL) (Evans, 1991). Ahora bien, su aplicación puede ser limitada por el costo que ésta representa (Gordon, 2004).

En relación con la inseminación a través del cérvix, encontramos reportes de porcentajes de preñez que podrían ser semejantes a los que se obtienen del procedimiento por laparoscopia, pero eso solo es cierto cuando el semen es depositado intrauterinamente, y no en cérvix, cosa que solamente es posible en el 50% de las ovejas (Gordon, 2004). El porcentaje de penetración cervical (porcentaje de ovejas en las cuales es posible atravesar con la pipeta de inseminación completamente por el cérvix hasta llegar al útero) se identificó como un factor muy importante que limita el uso comercial de esta técnica (Mckusick *et al.*, 1998; Gordon, 2004). Campbell y colaboradores (1996) realizaron un estudio que consistía en la evaluación macro y microscópica del tracto reproductor (cérvix en especial) en animales sacrificados luego de la inseminación transcervical; los resultados fueron impresionantes, pues el daño que esta técnica causa a la pared cervical en el 100% de los casos es variable pero constante, y se concluye que el bienestar animal y la ética profesional deben ser una prioridad.

La transferencia de embriones es una TRA que se utiliza para el mejoramiento genético a nivel mundial (Gibbons & Cueto, 2004). Aun teniendo evidencia de cuánto se ha mejorado la eficiencia reproductiva de los hatos a través de las TRA (junto con el mejoramiento de pastos, nutrición y asistencia veterinaria), la IA es la única que verdaderamente se utiliza actualmente en programas de selección. Se debe recordar e informar a los productores que la ovulación múltiple y transferencia de embriones pueden aumentar la ganancia genética de 15-40% en hatos pequeños y en grandes puede llegar hasta el 100%. Ahora bien, si se continúa tecnificando la producción (de manera semejante a las producciones bovinas) como ha sucedido hasta ahora, podríamos esperar que los genetistas continúen desarrollando y perfeccionando técnicas diferentes a la inseminación artificial (Loi *et al.*, 1998).

Hasta hace muy poco en nuestro país el manejo reproductivo y la aplicación de las TRA no han sido realizados de manera intensiva; en gran parte por la falta de conocimiento sobre las capacidades generativas del negocio, que se veía reflejado en la ausencia (casi total) de profesionales capacitados en la materia. Según se demostró anteriormente el potencial de estos sistemas productivos es inmenso, por lo que la necesidad de obtener entrenamientos como el realizado por medio de esta pasantía nunca ha sido mayor y traerá grandes beneficios y competitividad a la industria pecuaria nacional.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Adquirir y desarrollar destrezas en Técnicas Reproductivas Asistidas (TRA) en la especie ovina.

1.3.2. Objetivos Específicos

- i. Realizar la inseminación artificial intracervical por medio de la extracción de semen fresco y su dilución.
- ii. Ejecutar la técnica de inseminación artificial intrauterina por medio de laparoscopia.
- iii. Realizar las técnicas de recolección, preservación y transferencia de embriones.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Área de trabajo

La pasantía se realizó con la empresa chilena OVITEC (www.ovitec.cl), con sede en Punta Arenas, Chile (ubicada en la Patagonia Chilena) (Figura 2) y se basó en la participación de las visitas a cinco fincas de producción ovina (Punta Delgada, Las Coles, María Isabel, Cerro Negro y María Cristina), que conformaron parte del plan de trabajo de dicha compañía, cuyo fin es, por medio de técnicas reproductivas modernas y de punta a nivel mundial, el mejoramiento genético del hato ovino nacional chileno.



Figura 2. Punta Arenas, Chile.

Esta empresa fue creada para mejorar la producción ovina chilena, mediante la utilización de las TRA. Trabajan a nivel de campo, directamente con los ganaderos y sus fincas, además forman parte de la red suramericana OVIS XXI (empresa en red, sudamericana, que integra a técnicos, ganaderos, productores comerciales e industriales relacionados con la producción ovina), y su misión es: “contribuir al desarrollo del sector ganadero regional y nacional, a través de la oferta de servicios y tecnología que permitan mejorar la rentabilidad de los sistemas de producción y al mismo tiempo la sustentabilidad de los mismos” (OVITEC, 2006).

2.1.2. Sistema de producción y registros de las fincas

Las cinco fincas utilizaban únicamente sistemas extensivos de pastoreo (coirón: *Festuca gracillima*), con la excepción de la hembras donantes de embriones, a las cuales se les suplementó con cubos de alfalfa durante el proceso de superovulación, inseminación y lavado.

Los registros (por parte de los propietarios de la finca) solo se llevaban de manera rigurosa en todo el proceso de TE (María Cristina y Cerro Negro) e IAL (María Isabel y Las Coles): número de identificación, raza, carnero utilizado y sus características. En cuanto a la IAC (Punta Delgada) no se llevó ninguna anotación más que la cantidad de ovejas inseminadas diariamente.

2.1.3. Cronograma y Horario de Trabajo

La pasantía inició el 25 de abril de 2011 y finalizó el 30 de junio del mismo año, con una duración total de 10 semanas y un horario de lunes a domingo, de aproximadamente de 7 am a 7 pm.

2.1.4. Registro de Datos

Para la recopilación de la información se utilizó una bitácora de uso diario en la que se llevó el control de las actividades realizadas (IA, TE, etc.), así como la cantidad de animales abordados y las observaciones necesarias. Además se tomó fotos de algunos animales y de los pasos de los procedimientos realizados.

2.2. Animales

Se trabajó con un total de 30,918 hembras de las razas Merino Multi-Propósito (MPM), Corriedale y cruces y 38 machos reproductores MPM puros. Las hembras comprendían entre las edades de 1-4 años y los machos entre 2-6 años.

2.3. Manejo y abordaje de los machos

La manipulación de machos solo se realizó para una TRA: inseminación intracervical (IAC) y para considerarla como una opción para el mejoramiento genético de un hato, primero tuvimos q estar seguros de contar con carneros de alta genética. En OVITEC se procedió de la siguiente manera: se reunieron los mejores carneros de todas las fincas (alrededor de 15 fincas) en una sola finca (Cerro Negro) donde se realizó la selección de esos machos reproductores.

2.3.1 Selección de carneros

La selección de carneros reproductores consistió en separar los animales en 6 categorías (Top A, Top, Uso Estancia, Superior, Mejorador e Iniciador), para esto se observaron características fenotípicas (por observación y palpación) como: calidad de la lana (Figura 3), conformación general, conformación de patas, pezuñas, conformación de cabeza,

cobertura de lana en cara (se busca cara limpia, sin lana), escroto, testículos, epidídimo, prepucio, buen estado de salud en general, entre otras. Esta clasificación la realizaron especialistas en el campo y se compararon con las características genéticas conocidas, en el caso de los ya maduros, principalmente la descendencia que haya producido, en el caso de los primerizos su ascendencia o pedigrí (Evans & Maxwell, *et al.*, 1990).

Los carneros Top A y Top (38 animales, algunos ya habían sido utilizados en años anteriores) son usados como reproductores y todos son producto de IA por laparoscopia (semen MPM australiano) o de transferencia de embriones (importados de Australia). Esos 38 carneros son los que compusieron el “catálogo de semen” y luego fueron repartidos (para realizar IAC) según las necesidades de cada finca.

2.3.2. Entrenamiento de carneros

El primer día consistió solamente en colocarles bozales y amarrarlos (Figura 4) para que se acostumbren a la sensación, este paso es de suma importancia ya que es lo que nos va a permitir la correcta restricción, necesaria para su manipulación durante los días de colecta de semen. En la tarde se empezó a manipular con caricias, masajes y palabras, de manera que se fueran acostumbrando a la presencia humana, se alimentaron bien y se les brindó un buen confort. Se requirió de hembras en celo, que se indujeron con estrógenos a dosis de 0.5 cc intramuscular (IM) de cipionato de estradiol 3-4 días antes, como lo recomienda Gibbons & Cueto (2007). Luego se confirmó mediante el uso de carneros maduros y se colocaron en cepos con los carneros en entrenamiento alrededor de ellas, ya que la visión y el olfato son muy importantes durante el proceso de aprendizaje del comportamiento sexual, incluso se realizó la monta mientras los demás observan (Evans & Maxwell, 1990; Aguirre *et al.*, 2005).

Este proceso tardó una semana completa ya que no solo se entrenaron a los animales sino también al personal humano y paralelamente a esto también se capacitó a la gente a montar el laboratorio y todas las funciones a realizar dentro del mismo.

Una vez seleccionados los machos de mayor genética, se dividieron en subgrupos, cada uno con destino a fincas diferentes, según sus características físicas y la utilización en años anteriores para evitar problemas de consanguinidad.



Figura 3. Selección de carneros



Figura 4. Entrenamiento de carneros

2.3.3. Repartición de carneros

Antes del inicio de la época reproductiva (de manera anual), técnicos de OVITEC se reunieron en cada finca, discutieron los aspectos a mejorar y las metas que deseaba alcanzar cada productor. Es con base en estas metas (que incluyen características específicas a mejorar en sus animales) que se realizó la selección de los carneros para cada finca individualmente, funciona, por así decirlo, como un catálogo de carneros en pie, no de semen.

2.3.4. Carneros marcadores (Retajos)

Los carneros destinados para este propósito fueron vasectomizados. La cirugía se realizó 1 mes antes del inicio de la IA. Su función fue básicamente detectar diariamente las hembras en celo, las cuales eran inseminadas ese mismo día. La cantidad de marcadores utilizados fue de 7% del total de las ovejas.

El método por el cual se detectan las ovejas en celo fue utilizando un arnés con dispositivo de pintura en el pecho de los machos marcadores (Figura 5), el cual les deja una marca visible en la grupa a las hembras montadas (en celo); se debe tener en cuenta las consideraciones específicas según el dispositivo a utilizar, ya que el resultado depende de la temperatura ambiental.

Todos los días en la mañana se reunieron las hembras correspondientes según el protocolo de sincronización de celo y se realizó la selección. Las elegidas debieron ser inseminadas durante ese día y por ningún motivo se dejaron para el día siguiente. Los arneses fueron revisados y ajustados en este mismo momento (a diario) según la necesidad de cada carnero para asegurarnos el buen desempeño de los ejemplares (Figuras 6 y 7).



Figura 5. Carneros marcadores con arneses



Figuras 6 y 7. Reacomodo de arnés diario

2.4. Manejo y abordaje de las hembras

2.4.1. Condición de las hembras

Se contó con hembras de buena condición corporal (en este caso de 2.5-3.5) y que gozaban de buen estado de salud (dientes, patas, ubre, vulva) (Fierro *et al.*, 2005; Olivera & Gil, 2005; Latorre & Sales, 2010) y el destete se llevó a cabo 8 semanas antes de iniciar el proceso de IA, lo cual concuerda con lo dicho por Evans y Maxwell (1990) y además no se realizó ningún otro manejo estresante durante 2 meses post IA (como esquila o baños).

2.4.2. Técnicas Reproductivas Asistidas

2.4.2.1. *Inseminación Artificial Intracervical con Semen Fresco*

Como protocolo de sincronización de celos se utilizó una sola dosis de prostaglandinas (Pg), ya que se contaba con un número muy grande de animales a inseminar (sobre 30 mil); el uso de doble dosis significaba grupos de más de 5 mil animales en un solo día para lo que se requería de 3-4 equipos de personal e instalaciones de mayor envergadura, lo cual habría sido

imposible. Por lo tanto, por aspectos prácticos el protocolo de elección fue el de 1 sola dosis de prostaglandina F 2 *alfa* (PgF2 α) (Figura 8).

La dosis utilizada fue de 125 mg (1 cc de Cloprostenol IM, Ovolute®) y la detección de celo se hizo con carneros vasectomizados (Gibbons y Cueto, 2007).

Como Gibbons (1995) menciona, con este protocolo de sincronización los celos se presentan más dispersos que con otros tratamientos, por lo que la IA se realizó previa detección de celos y no fue necesario mantener en ayuno a las hembras antes del procedimiento.



Figura 8. Esquema de protocolo de IAC

En cuanto al montaje del laboratorio lo primordial siempre fue la limpieza y desinfección de toda el área y equipo a utilizar; se realizaba diariamente todas las veces que fuera necesario.

Se iniciaba determinando la sección limpia del laboratorio (donde se realizó la dilución y evaluación de semen), sucia (desarmado de vaginas ya utilizadas), de lavado, fuente de calor (calentador ambiental, que debe mantener la temperatura del laboratorio según Gibbons -1995- entre 20-25°C sin corrientes de aire) y fuente de calor para hervir agua (leche descremada - Figura 11 - y vaginas artificiales).

Para realizar la extracción de semen se utilizó una vagina artificial (VA), que se armó de la siguiente manera:

1. Se colocó el hule (látex) dentro de la VA (tubo de aluminio) y se fijó por el extremo inferior con una liga.
2. Se llenó de agua alrededor de 45-50°C (para que la temperatura externa, en contacto con pene, sea la ideal: 36-38°C), entre vagina y hule (la parte interna del hule, la cual entra en contacto con el semen nunca debe entrar en contacto con el agua o cualquier otra sustancia espermicida) (Evans y Maxwell, 1990; Gibbons & Cueto 2007).
3. Se fijó la parte superior del hule con otra liga.
4. Se colocó el vaso colector dentro del extremo inferior del hule ya sujetado.
5. Se infló la vagina por la válvula reguladora de presión.
6. Se verificó que hubiera suficiente presión.
7. Se lubricó la parte superior del hule por donde se introducirá el pene (gel estéril, no espermicida)
8. Se envolvió el vaso colector (temperado) con papel desechable.
9. Se introdujo toda la vagina en la manga protectora que es de un material especial, diseñada para aislar la temperatura, luz y polvo.

Siempre fue de suma importancia que la vagina estuviese limpia y seca antes de cada recolección. Se lavó perfectamente, enjuagó con agua destilada y secó exhaustivamente entre carneros. Además de que todo material que entró en contacto con el semen se calentó a alrededor de 30°C (Evans y Maxwell, 1990); en este caso se mantuvieron próximos al calentador de ambiente.

El procedimiento de extracción utilizado fue el siguiente:

1. Se empezó acercando el carnero a la oveja en el cepo (previamente esquilada en su región perivulvar para evitar contaminación) y se le dio su tiempo para que se

estimulara solo, la persona encargada de la extracción se colocó a un lado de los animales, listo para la manipulación del animal y de la vagina artificial.

2. Se limpió con toalla desechable el prepucio (Figura 9).
3. En el momento que el carnero saltó se colocó la vagina artificial de manera que quedara casi a la misma altura que la de la oveja, se introdujo el pene (Figura 10).
4. El característico golpe de riñón indicaba que ya había eyaculado e inmediatamente se volvió a colocar la VA en posición vertical y se abrió la válvula para que salga el aire y todo el semen fuera depositado por vacío en el vaso colector (Evans y Maxwell, 1990)

Si algún carnero realizaba dos saltos seguidos, estos se recogían y se llevan al laboratorio, pero se debía tener presente a ese animal para evitar un futuro desgaste, proporcionándole a ese ovejo un día más de descanso (Evans y Maxwell, 1990). Todo este proceso tomaba alrededor de 1-3 min dependiendo de la libido, cansancio y distracciones, del carnero.

Se utilizó a cada carnero 4 días seguidos, en promedio seguidos de 2 días de descanso.



Figura 9. Limpieza de prepucio



Figura 10. Extracción de semen

La técnica de dilución de semen utilizada fue la siguiente:

1. Se extrajo la vagina de la manga protectora.
2. Se retiró el vaso colector con cuidado de que no caiga agua ni polvo, bien envuelto en el papel desechable y cubierto con la mano para mantener la temperatura y proteger de la luz.
3. Se midió el volumen del eyaculado y se observaban características macroscópicas (olor color, consistencia).
4. Se procedía a observar al microscopio una gota a 40X en un portaobjetos temperado y se determinaba la motilidad u onda de movimiento de los espermatozoides (EPZ), se midió según la onda de movimiento característica del semen cuando se observa al microscopio que incluso puede ser observado simple vista; este es el método más sencillo de determinar la motilidad cuando se trata de material fresco.

A la consistencia-color y motilidad se les asignó una calificación subjetiva del 1-5 (Cuadro 1) donde 1 es malo y 5 es muy bueno. Todo lo que fuera clasificación 4 y 5 fue utilizado para IA, de 3 o menos se desechaba por las posibilidades de dar menor fertilidad (Evans y Maxwell, 1990).

Recordatorio: todo el material que entró en contacto con el semen debió estar temperado y libre de agua, desde pipetas y portaobjetos hasta componentes de la VA.

Cuadro 1. Sistema de calificación según movimiento en masa

Calificación	Clase	Descripción
5	Muy buena	Densa, rápido movimiento en ondas, no se logra observar EPZ individuales, >90% activo.
4	Buena	Movimiento vigoroso, pero menor que el de calificación 5, 70-90% activo.
3	Pasable	Solo hay ondas de movimiento lento. Se observan EPZ aislados, 40-65% activo.
2	Pobre	No se ven ondas, se observan EPZ individuales en movimiento, 20-40% activo
1	Muy pobre	Menos del 10% EPZ activos, pero movimientos muy débiles
0	Muerto	No hay movimiento aparente

(Evans & Maxwell, 1990; Youngquist & Threlfall, 2007)

En cuanto a la concentración, no se realizó su medición como tal, es decir en conteo (hemocitómetro, etc.), pero sí se realizó por métodos basados en la consistencia, apariencia del semen y lo observado al microscopio para movimiento en masa (Cuadro 1) (Evans y Maxwell, 1990).

La consistencia del semen depende de la proporción de sus componentes: EPZ y plasma seminal; donde las de mayor consistencia presentan más EPZ y las de menor tienen menos y por lo tanto son más acuosas (Cuadro 2) (Evans y Maxwell, 1990).

Cuadro 2. Concentración de semen según su consistencia

Clasificación	Consistencia	N° de EPZ (x10 ⁹) por ml	
		Media	Valores extremos
5	Creмосa	5.0	4.6-6.0
4	Creмосa lechosa	4.0	3.5-4.5
3	Lechosa	3.0	2.5-3.5
2	Poco lechosa	2.0	1.0-2.5
1	Turbio	1.0	0.3-0.9
0	Acuosa	Insignificante	

(Evans y Maxwell, 1990)

5. Según los valores obtenidos con los Cuadros 1 y 2 se procedió a diluir (1:1 – 1:5), con leche descremada previamente calentada en baño maría (de agua hirviendo, sin que salpique dentro de la leche) por 8 minutos; esto, según Evans y Maxwell (1990), inactiva los factores tóxicos de la fracción proteica (no se debe hervir) y luego se mantiene a 30°C (Figura 11).

Existen varias posibilidades de diluyentes, pero la leche descremada representa el método más sencillo, por la disponibilidad. La dilución (con ambos componentes a 30°C) se realizó con una pipeta calibrada, se aspiró la cantidad adecuada de diluyente (según el grado de dilución necesaria) y se adicionó al semen, nunca a la inversa porque se pueden alterar los EPZ y por lo tanto su motilidad (Evans y Maxwell, 1990). Se adicionó lentamente y por las paredes del envase, nunca directa o bruscamente.



Figura 11. Leche descremada en baño maría a 30°C

6. Se colocó papel de aluminio para tapar el vaso colector y protegerlo de la luz y el polvo.
7. Se posicionó el semen diluido ya listo para inseminar en baño maría a 30-32°C (en el mismo de la figura 11) y se mantuvo ahí hasta ser utilizado, con el fin de mantener la temperatura constante.

Nunca se realizaron cambios bruscos de temperatura, de ser necesario se realizaron de poco en poco. Pero preferiblemente se dejó que baje la temperatura paulatinamente y se revisó la viabilidad del semen luego de esos cambios. Siempre se mantuvieron 1-2 saltos en el baño además del (los) que esté en el termo del (los) inseminador(es). Por cualquier eventualidad de que se regara, cayera, quebrara, de esta manera nunca quedaron espacios de tiempo en que no se está inseminando.

En cuanto al equipo que se utilizó para la IAC fue sumamente sencillo: vaginoscopio sencillo, fuente de luz de cabeza (o vaginoscopio con fuente de luz incorporado), la pistola de inseminación (Figura 12) y toallas desechables (Evans y Maxwell, 1990).



Figura 12. Pistola de inseminación

El método más sencillo y rápido para la sujeción de las hembras era sostenerlas en posición de estación, de pie (aunque este es preferido para inseminación artificial intravaginal -IAV- y no tanto para IAC) (Evans y Maxwell, 1990). En este caso se contó con un amplio corral, con una manga a cada lado que desembocaba en el carrito para IAC en el que se colocó la oveja (extremo caudal de la oveja queda viendo hacia la ventana de inseminación y el craneal hacia la puerta solo sostenida por el operador), se deslizó hacia la ventana de inseminación, el operador sujetó la cola levantada, se procedió con la IAC y se dejó libre la oveja (el operador la soltó) (Latorre & Sales, 2010).

La técnica IA utilizada fue la siguiente:

1. Cada inseminador contaba con su termo con agua a la misma temperatura a la del baño maría (30-32°C) donde se mantenía el semen. Un ayudante se encargaba de que siempre tuvieran semen en sus termos y de indicarles a los realizadores de saltos cuando se requería uno nuevo.
2. Se limpió la vulva con toalla desechable de uso único.

3. Se introdujo el vaginoscopio por la vagina, no es necesario lubricar ya que la hembra en celo está naturalmente lubricada.
4. Se ubicó el cérvix (normalmente ubicado en la base de la vagina) (Figura 13).
5. Se colocó la punta de la pistola de inseminación (que siempre debe estar, limpio, seco y temperado) lo más profundo posible en cérvix sin emplear fuerza, se extrae un poco el vaginoscopio (que permite el cierre de la vagina anterior y evita reflujo seminal) y se depositó un volumen de 0.2 ml de dilución, que equivalían a tres gatillazos (previamente calibrados), esto para que se dividiera la dosis completa de inseminación en tres partes y así evitar un posible reflujo-desperdicio de semen, además de una subdosificación en la inseminación (Figura 14).
6. Se retiró el inyector y luego el vaginoscopio.
7. Se limpió el equipo entre oveja y oveja y se dejó el inyector cerca de bolsa de agua caliente para mantener temperado.
8. Se llevó registro de cuántas ovejas se inseminaron por cada salto del carnero, de esta manera se puede comprobar que la dilución estuvo bien realizada.

Todo el proceso de IA se dio de manera fluida y no se detuvo nunca por falta de semen, sin someter a estrés a las ovejas inseminadas (ej.: perros, gritos, manejo brusco).

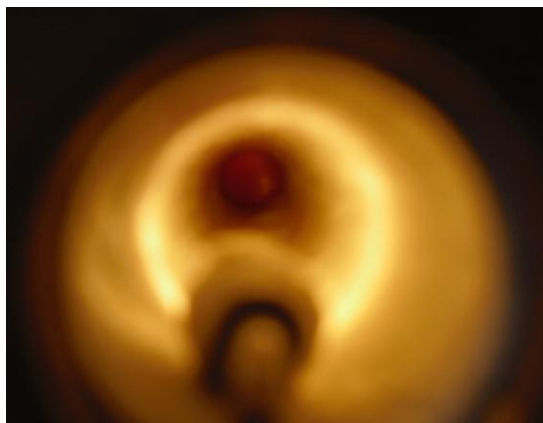


Figura 13. Cérnix observado con vaginoscopio



Figura 14. Inseminación Artificial Intracervical

En este proceso de IAC, se contó con carneros repasadores (de buena genética, similar o un poco inferior a la de los de extracción de semen) que son los que se añadieron a las hembras inseminadas 15 días post IA, con el fin de poder determinar por medio de ultrasonido la edad de la preñez y poder separar corderos nacidos de IA o de monta natural (MN) Gibbons y Cueto (2007).

2.4.2.2. *Inseminación Artificial por Laparoscopia con Semen Congelado*

Para la sincronización se utilizaron métodos farmacológicos basados en utilización de progestágenos (esponjas de 60 mg de medroxiprogesterona) y dosis inyectable de 300 UI IM de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Novormon®) al retiro de las esponjas (12 días posterior a su colocación) (Figura 15). El sistema de IA utilizado fue a tiempo fijo (IATF), que según Olivera *et al.* (2007) evita la detección de celos y permite organizar la mano de obra necesaria más eficientemente. La IA se realizó 48-54 horas post-retiro de esponjas (Gibbons, 1995).

Las esponjas fueron colocadas con unas pinzas largas, además vienen equipadas con un hilo, que permanece expuesto durante todo el tratamiento, para facilitar su posterior retiro. Se realizó desinfección de la pinza entre una oveja y otra.

Si las esponjas quedan colocadas correctamente, el índice de pérdidas no debe superar el 1-2% (Evans & Maxwell, 1990). Es importante revisar bien estas hembras con espéculo para asegurarnos que no quede con el dispositivo dentro y que nada más hayan perdido el hilo o que no haya quedado expuesto.



Figura 15. Esquema de protocolo de IAL

En el laboratorio de inseminación se contaba con:

- Calentador de agua a 35°C para descongelar semen.
- Tubos de ensayo para depositar el semen y cargar dosis.
- Baño maría en 30-32°C para mantener el semen descongelado en tubo de ensayo temperado.
- Microscopio objetivo 40X para evaluación de semen, cubre y portaobjetos.
- Pipeta de inseminación con aguja hipodérmica de 5 mm (Robertson®), se une a jeringa de 1.0 ml para la aspiración correcta de dosis y su expulsión (Evans y Maxwell, 1990).
- Solución salina para limpiar inyector.

- Laparoscopia con 2 trócares y cánulas, unos para la cámara (fuente de luz y cable de fibra óptica) con conducción de gas y válvula de dos vías (por si es necesario insuflar para mejor visualización de órganos) y otro para la pipeta de inseminación (Evans y Maxwell, 1990); todo este material estuvo sumergido en solución esterilizante antes de empezar y entre oveja-oveja y entre semen-semen.
- 2 Camillas de volteo, que permite agilizar el proceso: mientras se insemina a una oveja, los operarios están fuera del laboratorio preparando a la siguiente.
- Tanque de dióxido de carbono para insuflar.
- Amonio cuaternario (puede ser solución yodada) para desinfectar entre oveja y oveja.

Para la sujeción de ovejas se utilizaron las camillas de volteo (Figura 16) que estaban equipadas para sujetar las ovejas de los corvejones y contaban con unos ganchos delanteros para sujetar los miembros anteriores; las ovejas se colocaron en decúbito dorsal. Una vez que se rasuraron y desinfectaron se introdujeron al laboratorio (que está a puerta cerrada para mantener temperatura alrededor de 20°C con calentador ambiental) (Figuras 17 y 18).



.Figura 16. Camillas de volteo



Figuras 17 y 18. Sujeción de ovejas para IAL

Para la descongelación del semen se procedió de la siguiente manera:

1. Se descongelaron las pajillas de semen en calentador de agua ($35-37^{\circ}\text{C}$) por 40-60 segundos.
2. Se cortó el sello de las pajillas.
3. Se colocaron dentro del tubo de ensayo en baño maría o baño en seco, donde se mantuviera la temperatura del semen constante.
4. Se cortaron los sellos de algodón y se depositó todo el semen en el tubo (se soplan de ser necesario para sacar todo el semen).
5. Se observó una gota al microscopio para asegurarnos de la viabilidad del semen (debe de haber un 50% mótil).
6. Para la dosis de inseminación se cargó primero alrededor de 0.1 ml de aire en el inyector (Figura 19), luego se introdujo dentro del semen y se aspiró la misma cantidad de semen y se repitió (0.1 ml de aire y 0.1 ml de semen), de manera que quedaran las

dos columnas de semen separadas por un burbuja de aire (Figura 20). La dosis total es de alrededor de 0.2-0.25 ml de semen por pajilla.

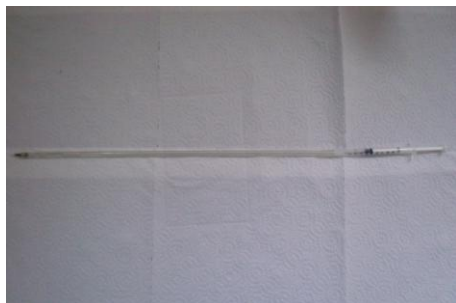


Figura 19. Inyector unido a jeringa de 1.0 ml.

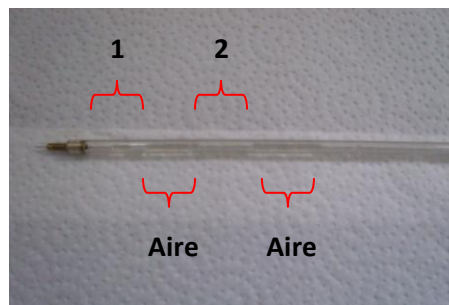


Figura 20. Dosis de semen

Los pasos de la técnica de inseminación utilizados se describen a continuación:

1. Se depiló la zona alrededor de la ubre y los primeros 10-12 cm del abdomen (Evans y Maxwell, 1990).
2. Se limpió con jabón antiséptico.
3. Se desinfectó con alcohol-yodo.
4. Se realizó una incisión superficial (solo piel) de 1 cm de largo a unos 3 cm de línea alba con bisturí (este paso se puede omitir).
5. Se introdujo el primer trócar a la izquierda de la línea media en dirección caudal para evitar lesionar órganos de la cavidad abdominal o grandes vasos, seguidamente se intercambió este por la lente.
6. Se insufló la cavidad abdominal que facilita la introducción del siguiente trócar a la derecha de la línea media, la cantidad de gas fue apenas la necesaria para poder

visualizar y no demasiada como para provocar molestias en el animal (Evans y Maxwell, 1990).

7. Con la ayuda de las pinzas se ubicaron y acomodaron los cuernos uterinos para la inseminación.
8. Se reemplazó el trócar derecho por el inyector cargado con semen en el lado derecho del animal.
9. Se depositó media dosis en cada cuerno, esto fue más fácil al tenerla separada por una burbuja de aire.
10. Se desinsufló la cavidad por orificio para introducir los trócares, se retiraron todos los instrumentos y aplicó una pequeña cantidad de aerosol larvicida en cada herida (Evans y Maxwell, 1990).
11. Se limpió el inyector entre oveja y oveja con solución salina estéril temperada a baño maría, en el mismo donde se mantiene el semen (Evans y Maxwell, 1990).
12. Se llevó registro de datos, cuántas y cuáles ovejas fueron inseminadas con cada carnero (semen congelado). Después estos pueden ser comparados con los nacimientos y darnos una idea de la capacidad de los sementales individualmente (Evans y Maxwell, 1990).

Fue de suma importancia la reducción de estrés y el aporte de muy buena nutrición a las ovejas recién inseminadas, que probablemente dio un efecto directo sobre los porcentajes de fertilidad.

2.4.2.3. *Transferencia de embriones*

Para el proceso de transferencia embrionaria (TE) se contó con dos grupos de animales (las donantes y las receptoras) y consistió en la producción de múltiples embriones, con la ayuda de protocolos hormonales de superovulación en cada donante (de muy alta genética), los cuales se transfirieron a varias hembras receptoras (de menor genética, sanas y buenas madres) (Youngquist & Threlfall, 2007; Gibbons & Cueto, 2010).

Los criterios de selección aplicados fueron bastante diferentes entre donantes y receptoras. La elección de las donantes se basó principalmente en su valor genético y las características propias de la raza manejada en cada sistema de producción que se desean mejorar (esto aplica igual para la elección de macho, sea semen fresco o congelado). Se prefirió que fueran hembras adultas que hubieran tenido al menos un parto y que tuvieran al menos 2 meses post parto (para evitar una baja en producción embrionaria). A pesar de que se habrían podido utilizar corderas, era imperativo que hubieran alcanzado el 75% de su peso adulto, ya que se espera preñar a las hembras inmediatamente posterior a la recolecta de embriones para disminuir posibilidad de adherencias (Gibbons & Cueto, 2010).

En cuanto a las receptoras se escogían hembras adultas, que hubiesen llevado a cabo gestación(es) previa(s), con partos exitosos y buenas lactancias, en resumen, hembras probadas como muy buenas madres (Gibbons *et al.*, 2010).

En general, al igual que en las demás TRA, todos los animales utilizados debían ser animales de buen estatus nutricional (condición corporal), sanitario y reproductivo. Las pruebas laboratoriales requeridas (Aftosa, Brucelosis, parasitosis, etc.) se debían realizar con antelación. De igual manera, si fuera necesario recurrir a instalaciones extrañas y/o realizar

mezcla de animales de diferentes lotes se debía permitir a los animales un periodo de aclimatación de al menos 1 mes, para evitar que el estrés afectara la respuesta a los protocolos hormonales (Gibbons & Cueto, 2010).

La identificación y toma de registros fue de suma importancia, si se debía identificar animales (aretes, tatuajes, etc.); al igual que realizar desparasitaciones, vacunaciones o cualquier manejo que represente situaciones de restricción estresantes para los animales; se hizo con al menos 1 mes de anticipación (Gibbons & Cueto, 2010).

El protocolo completo al que fueron sometidas las 24 donantes y 350 receptoras es el siguiente (Figura 21):

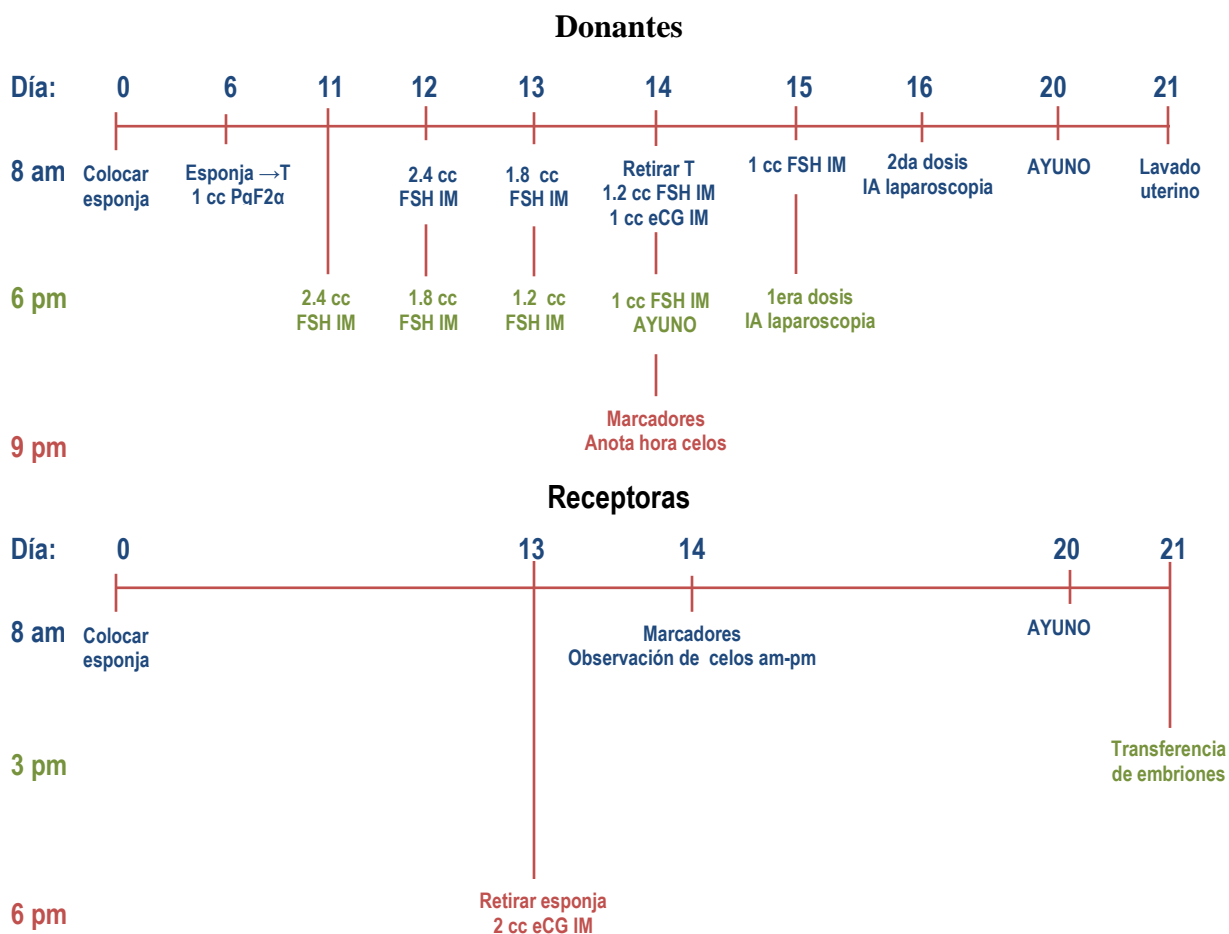


Figura 21. Esquema de protocolo de TE

Para la preparación quirúrgica de las donantes se procedió de la siguiente manera:

1. Sedación con 0.5 ml de Xilacina IM
2. A los 10 minutos de inyectado el sedante se colocó al animal en la camilla y se procedió a la depilación del área y desinfección quirúrgica (alcohol-yodo).
3. Seguidamente se aplicó anestesia con Tiopental (1g diluido en 10 cc de suero fisiológico) a una dosis de 0.7 cc por cada 10 kg de peso vivo.
4. Se colocaron campos estériles desechables.

El procedimiento quirúrgico de lavado de embriones se realizó de la siguiente forma:

1. Se realizó una incisión de 3-4 cm de largo cortando solo la piel con el bisturí, a 2 cm de la línea media (paramediano derecho).
2. Se debridó con tijera roma.
3. Se perforó cavidad abdominal con tijera aguda (con cuidado de no lacerar órganos internos), se abrieron las tijeras para agrandar la incisión hasta poder introducir dos dedos. Luego se desgarró la pared con los dedos hasta crear una apertura de 4-5 cm. Se prefirió desgarrar a utilizar el bisturí, ya que permite que la apertura siga las fibras musculares en lugar de incidirlas, lo cual resulta en menor sangrado y facilita la sutura y cicatrización.
4. Se localizó el útero con 2 dedos, se atrapó un cuerno entre los dedos y suavemente se exteriorizó. Luego se expusieron los cuernos desde la bifurcación.
5. Desde el primer momento en que el útero se expuso hasta que se volvió a colocar en cavidad abdominal, se mantuvo húmedo con un atomizador de solución salina heparinizada (0.5-1L por animal).

6. Se sujetó el útero con gazas estériles alrededor de la incisión para evitar que se devolviera a la cavidad abdominal durante el lavado (Figura 22).
7. A nivel de bifurcación uterina, donde comienza el cuerno, se introdujo la pinza hemostática hasta llegar a lumen, solo con el fin de realizar un orificio (Figura 23).
8. Por el orificio realizado se introdujo la sonda Foley calibre 8, se colocó en posición y se infló el balón (1-2 cm de incisión). No debe ser muy adentro para poder lavar bien todo el cuerno, ni muy afuera para evitar desgarre del tejido uterino.
9. Al otro extremo de la sonda Foley se colocó el plato de Petri para recolección de embriones
10. Se introdujo el catéter calibre 18 en ápice del cuerno, cerca de la unión útero-tubárica, en el mismo cuerno uterino donde se colocó la sonda Foley y se retiró el estilete. Se produjo presión gentilmente en el punto de inserción del catéter, y se mantuvo hasta retirarlo, para evitar reflujo del líquido.
11. Se adaptó una jeringa de 20 ml de plástico con la solución buffer de fosfato (en total 40 cc en cada cuerno) en el catéter para lavado de embriones. La solución se hizo correr por todo el cuerno acarreado los embriones y se dejó salir por la sonda Foley en la base de los cuernos hasta el plato de Petri.
12. Se realizó un suave masaje (en forma de ordeño) en el cuerno para asegurarse de extraer todo el líquido dentro del cuerno con embriones.
13. Se retiró la sonda Foley y se realizó un punto en X (Vycril 3-0) en la serosa y el miometrio, se retiró el catéter y se repitió el procedimiento en el otro cuerno.
14. Ambos platos de Petri se le pasaron al encargado de embriología que procedió a su búsqueda y clasificación.

15. Se suturaron el peritoneo y el músculo con 3 puntos en X (Vycril 1, aguja roma)
16. Se suturó piel con 2 puntos en U.
17. Se aplicó aerosol larvicida y 3 cc de Penicilina-Estreptomicina IM + 1 cc de prostaglandina $f2\alpha$ IM (Gibbons & Cueto, 2010).

Todo el procedimiento anterior se resumen ilustra en la Figura 24.



Figura 22. Útero expuesto



Figura 23. Pinza hemostática en base de cuerno uterino

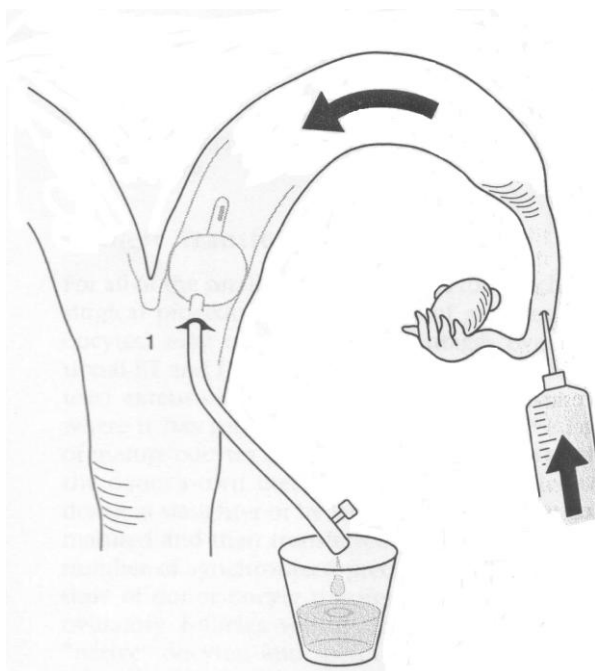


Figura 24. Ilustración de lavado de un cuerno uterino
(Youngquist & Threlfall, 2007)

La búsqueda y clasificación de los embriones se realizó a un aumento de 10X con un estereoscopio y en la placa de Petri en la que fueron recuperados (Figura 25). El ambiente de manejo de embriones se mantuvo a temperaturas superiores a 20°C y los embriones se tuvieron sobre platinas térmicas (Figura 26) en todo momento. Las placas de petri se revisaron varias veces ya que algunos embriones pueden encontrarse flotando o inclinados y “escondarse” durante la primera revisión. Conforme se iban encontrando, con la ayuda de una micropipeta se iban pasando a otros platos con medio de “holding” para su mantenimiento, hasta su transferencia o bien su congelación (no pasó más de 2 horas de su recuperación y su siembra-congelación). Todo lo anterior se realizó en las mejores condiciones de esterilidad posibles (Gibbons & Cueto, 2010).

Se continuó con su clasificación, en aumento de 10-40X en el estereoscopio, se basó en aspectos morfológicos (integridad de membrana pelúcida y esfericidad, con células claras, de contorno regular, con ausencia de opacidad: signo de degeneración celular) y se clasificaron en un rango que iba de 1-5 de acuerdo con los estándares de la International Embryo Transfer Society (IETS, 2010; Gibbons & Cueto, 2010). Con la ayuda de una pipeta de vidrio se movían para observarlos en diferentes posiciones y de diferentes ángulos. Dado que el embrión debe tener un desarrollo acorde con el día de colecta, solo se aceptaban embriones con un máximo de 24 horas de retraso (Gibbons & Cueto, 2010).

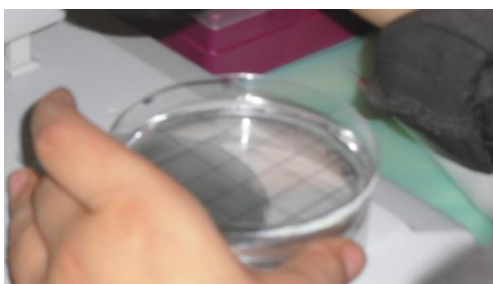


Figura 25. Búsqueda de embriones



Figura 26. Embriones sobre plantilla térmica

Para la técnica de siembra de embriones en receptoras se utilizó el procedimiento semi-quirúrgico, que combina el uso de laparoscopia con exteriorización de la punta del cuerno uterino ipsilateral al ovario con CL (Gibbons & Cueto, 2010; Youngquist & Threlfall, 2007).

La preparación quirúrgica se realizó de la siguiente forma:

1. Se anestesió con 1.7 cc de combinación Ketamina-Xilacina (1.5 cc de Xilacina en un frasco de 50 cc de Ketamina) IV en vena yugular. Apenas el animal se desvanecía se trasladaba a la camilla.
2. Se realizaba la depilación del área y desinfección quirúrgica (alcohol-yodo).

El procedimiento quirúrgico utilizado fue el siguiente:

1. Se depiló la zona craneal a la ubre, unos 5 cm de largo y ancho a ambos lados de la línea media (2 cm de ella).
2. El área depilada se desinfectó quirúrgicamente (alcohol-yodo).
3. Se realizó una incisión superficial (solo piel) de 1 cm de largo a unos 3 cm de la línea alba del lado derecho del animal (lado izquierdo del cirujano).
4. Se introdujo el trócar y luego se colocó la cámara. Del lado izquierdo del animal se realizó una incisión de 1.5 cm. de largo con el bisturí donde se introdujeron pinzas para manipular cuernos de manera que se visualizaran ambos ovarios por medio del laparoscopio (Figura 27). El ovario que presentaba mejor respuesta (más y mejores cuerpos lúteos - CL-) es el que definía en cual cuerno se sembraría el embrión, ya que según Görlach (1999) el embrión al ser colocado en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo presenta una acción antiluteolítica favorable para su supervivencia. Si los ovarios estaban atrésicos o con respuesta insuficiente se rechazaba la oveja como receptora y no se siembra ningún embrión (Gibbons & Cueto, 2010).
5. Se exteriorizó el extremo del cuerno uterino seleccionado con las pinzas uterinas.
6. Lo más cerca de la unión útero tubárica se realizó una pequeña punción con un clip metálico previamente esterilizado por la cual se introduce la pipeta Tomcat o catéter para fertilización *in-vitro* con la que se depositaba el embrión.
7. Se reposicionó el útero.
8. Se suturó un solo plano con un punto simple.
9. Se retiró la cámara sin suturar.

10. Se inyectaron 2 cc de Penicilina-Streptomicina IM y de ser necesario Meglumine Flunixin, para evitar luteólisis por exceso de manipulación.
11. Se aplicó aerosol larvicida en ambas heridas.



Figura 27. Manipulación de cuernos para observar la respuesta ovulatoria

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente, el ganado ovino es de las especies pecuarias más versátiles en cuanto a: 1) adaptabilidad a diversos ambientes y 2) proveernos de varios productos. Se debe tomar en cuenta la gran variabilidad que presenta esta especie según sus razas, por ejemplo, la raza, Booroola Merino por parto puede producir 6 crías en comparación con la gran mayoría de razas que dan de 1-3 crías por parto. Por lo tanto, una lista de recomendaciones no puede ser aplicada para todas las producciones, ya que estas deben de ser específicas según los animales disponibles y deseados. El diagnóstico, planes y metas se deben desarrollar específicamente para las condiciones de cada establecimiento, siempre conscientes de la realidad que rodea (Youngquist & Threlfall, 2007).

3.1. Detección de celos

Para asegurar el éxito de las IA es claro que la detección de celos debe realizarse de forma oportuna, de manera que se identifique la mayor cantidad de hembras en celo posible. Para esto existen dos posibilidades: utilizar celo natural (con su detección) o utilizar sincronización de celo (SC). En la segunda opción: debemos detectar celo o proceder a tiempo fijo (Evans & Maxwell, 1990). Ahora bien, ambas técnicas presentan ventajas y desventajas (Cuadro 3):

Cuadro 3. Ventajas y desventajas de utilización de celos naturales contra sincronización de celos

	Ventajas	Desventajas
Celo natural	Bajo costo económico (Evans & Maxwell, 1990)	Disponibilidad de equipo humano Detector de celos debe tener experiencia No agrupa hembras en celo Se prolongan procesos como los de IA
Sincronización	Acorta tiempo necesario para inseminar hatos más numerosos (Evans & Maxwell, 1990) Facilita manejo de preñez y parto (Evans & Maxwell, 1990)	Alto costo económico (Evans & Maxwell, 1990) Necesidad de uso de dispositivos y/o fármacos

(Evans y Maxwell, 1990; Wildeus, 2000; Pietro *et al.*, 2010)

Basado en la información anterior se debe, según las condiciones específicas de cada finca/productor/disponibilidad de recurso humano, económico etc., elegir lo más apropiado.

3.2. Protocolos de Sincronización de celos

Como se ha mencionado las ovejas son reproductivamente estacionarias, la duración de su ciclo estral (presente únicamente en su época reproductiva) es de 17 días (Wildeus, 2000), y se divide en una fase luteal del día 4 al 14 y una fase folicular del día 14 al 3 del ciclo estral (Uribe *et al.*, 2009). El estro dura de 24 a 42 horas (Wildeus, 2000) y se cree que el porcentaje de hembras que entran en celo diariamente es de 6-8% (Evans & Maxwell, 1990) en condiciones naturales; además no manifiestan síntomas claros de celo por lo cual es necesario emplear carneros marcadores.

La Sincronización de Celos se utiliza principalmente para hacer uso del tiempo y de la mano de obra con mayor eficiencia (Pietro *et al.*, 2010), ya que favorece que los animales entren en celo de manera agrupada, donde algunas combinaciones son más eficientes que otras, muchas veces dependiendo de la época reproductiva, comportamiento de cada animal, condiciones de manejo y ambiente, entre otras.

Existen dos métodos de sincronización de celos: farmacológicos y naturales. La principal diferencia es que los farmacológicos agrupan a las hembras en lo que a manifestaciones de celo se refiere, lo cual permite prefijar el tiempo de las inseminaciones, con la desventaja de que es más costoso (fármacos y personal). La forma natural es más económica pero no agrupa de manera estrecha a las hembras, punto crítico en manejos como los de la Patagonia Chilena con factores como: cantidad de animales, época reproductiva y excesivas distancias a recorrer entre finca y finca (Wildeus, 2000).

Los métodos naturales consisten básicamente en introducir el macho (entero o castrado androgenizado) con las hembras que estuvieron aisladas por varias semanas antes; se le denomina Efecto Macho. Si se destinaran a IA deben ser machos marcadores. Su principal desventaja es que solo ha sido efectivo en épocas antes del inicio de la época reproductiva; además, es completamente inefectivo en época reproductiva donde las hembras ya están ciclando o en épocas de anestro profundo como en época no reproductiva. (Evans y Maxwell, 1990; Wildeus, 2000). La otra posibilidad es el “flushing” nutricional o manipulación nutricional a corto tiempo (Wildeus, 2000).

Por otro lado la sincronización de celo con fármacos se basa en la manipulación de la fase luteal o folicular del ciclo estral de la oveja, donde según Wildeus (2000), en la fase luteal

se permite mejor control, ya que su duración es mayor y además la respuesta a la manipulación es superior.

Por popularidad los fármacos utilizados para programas de SC se han dividido en dos grupos: progestágenos y prostaglandinas (o análogos sintéticos). Los primeros simulan la fase luteal natural de la oveja, mientras que los segundos acortan la duración del cuerpo lúteo (CL) (Evans & Maxwell, 1990; Uribe *et al.*, 2008). Las ventajas y desventajas de estos procedimientos de SC se detallan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Ventajas y desventajas de los protocolos de sincronización de celos utilizando progestágenos o prostaglandinas.

	Ventajas	Desventajas
Progestágenos (esponjas, etc.)	Utilizable en cualquier época del año (no necesita que las ovejas estén ciclando) Excelente concentración de celos Mayor concentración sanguínea de P ₄ posterior a la sincronización	Mayor costo económico Posibilidad de inducción de infecciones vaginales Puede haber dificultad de retiro Colocación tediosa
Prostaglandinas o análogos sintéticos	Menos costo económico (Pietro <i>et al.</i> , 2010) Aplicación sencilla (inyección)	Ovejas <u>deben</u> estar ciclando La concentración de celos es menor (a solo una dosis) Menor concentración sanguínea de P ₄ posterior a la sincronización

(Evans & Maxwell, 1990)

3.2.1. Progestágenos

Se aplican por 12-14 días durante los cuales no hay ni aparición de celo ni ovulación, 2-3 días posterior a la supresión del tratamiento se da la manifestación de celo. El tratamiento cumple la misma función que un cuerpo lúteo, inhibiendo la liberación de las gonadotropinas,

Hormona folículo estimulante (FSH) y Hormona luteinizante (LH), necesarias para la manifestación de celo y ovulación (Evans & Maxwell, 1990; Raso *et al.*, 2006).

En diferentes estudios se ha demostrado que pueden llegar a ser de 4-20 veces más potentes que la progesterona (P₄) natural para suprimir el celo y la ovulación, razón por la cual pueden llegar a ser efectivos en épocas no reproductivas (Evans & Maxwell, 1990; Wildeus, 2000; Uribe *et al.*, 2008)

El método más conveniente de utilización de progestágenos es en el que solo se manipulan los animales dos veces (colocación y retiro), estos son los dispositivos intravaginales: esponjas (Figura 28) y Control Interno de Liberación de Droga (CIDR) (Figura 29). Al momento del retiro, el mejor resultado se da cuando se complementa el tratamiento con el uso de hormonas estimulantes de la ovulación, en este caso se utilizaron 300-500 UI de gonadotropina del suero de yegua gestante o gonadotropina coriónica equina (eCG), que según Evans y Maxwell (1990) y Córdova y colaboradores (1999) es la gonadotropina exógena más utilizada por su larga duración, solo precisa de una aplicación y la dosis utilizada (300 UI) es la recomendada para hembras en estación reproductiva. Evans y Maxwell (1990) también recalcan que es un producto de origen animal (natural) que aún con los mayores esfuerzos para estandarizarla varía considerablemente en su composición química y por lo tanto, se pueden ver afectados los índices de ovulación. Wildeus (2000) considera a su actividad de larga duración una limitación, porque causa reclutamiento continuo de folículos antrales, lo cual resulta en un gran número de folículos anovulatorios; esto ocurre especialmente cuando se utiliza en dosis para inducir superovulación, no tanto en dosis única. Wildeus también comenta que los porcentajes de fertilidad son considerablemente mayores

cuando los progestágenos se combinan con una dosis de eCG. Otra limitación que presenta la eCG es que la fertilidad se reduce luego de usos de largo plazo (Wildeus, 2000).

Las esponjas intravaginales utilizadas en este trabajo contienen 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MGA), las cuales según Evans y Maxwell (1990) son las recomendadas para ovejas en época reproductiva.

Existen otros métodos como los implantes subcutáneos o los progestágenos orales, que son otras alternativas aplicables para manejo de celos. Los subcutáneos se colocan a nivel de la oreja, funcionan de igual manera y tiempo que los intravaginales. Entre las desventajas de estos productos se encuentra el que a la hora del retiro se requiere hacer una incisión en piel con bisturí que deja heridas abiertas y susceptibles de infecciones, lo cual no los hace muy populares. Además, en cuanto a los progestágenos orales el principal problema es la dosificación (Evans & Maxwell, 1990).

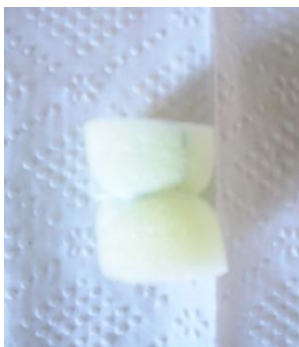


Figura 28. Esponja



Figura 29. Control Interno de Liberación de Droga

3.2.2. Prostaglandinas (Pg) o análogos sintéticos

La Pg actúa sobre el cuerpo lúteo provocando su lisis y un descenso en los niveles de P₄ (secretada por el mismo), que induce un pico de estrógenos y la liberación de las

gonadotropinas y por lo tanto el crecimiento folicular y el estro se manifiestan a los 2-3 días. El CL solo es sensible a las Pg entre los días 5-14 del ciclo estral por lo que las hembras que estén fuera de este rango no responderán a su aplicación (Evans & Maxwell, 1990).

Para la sincronización completa de un hato se requieren dos aplicaciones de Pg a un intervalo de 7-14 días, ya que la susceptibilidad del CL a las Pg dependerá de su momento en el ciclo, donde hay etapas en que no son del todo susceptibles a su efecto. El estro aparece normalmente a los 2-3 días de la segunda inyección (Evans & Maxwell, 1990; Wildeus, 2000). Wildeus, 2000, recomienda separar las dosis por 11 días. Sin embargo también existen protocolos que solo hacen uso de una dosis, realizando detección de celos 14-21 días postaplicación (Pietro *et al.*, 2010).

Es evidente que se requiere de la presencia de un CL en el ovario de la oveja para poder actuar, lo cual genera que una vez aplicada la primera dosis la dispersión de celos sea muy grande, ya que no todas las ovejas van a estar en fase luteal (no todas tendrán CL). La doble dosis de Pg logra que al momento de la segunda dosis todas las ovejas tengan CL y se concentren mucho más las manifestaciones de celo (Pietro *et al.*, 2010).

3.3. Técnicas Reproductivas

Durante la pasantía se trabajó con un total de 30,956 animales, de los cuales un 99,87% (30,918) fueron hembras y 0,12% (38) machos, todos fueron evaluados (características específicas mencionadas anteriormente) y aceptados para ser sometidos a las diferentes biotecnologías descritas, lo cual definitivamente contribuyó en la obtención de muy buenos resultados que se detallan en siguiente el cuadro:

Cuadro 5. Resumen de porcentajes de preñez obtenidos como resultados de las TRA.

	Total inseminadas/transferidas	Total preñadas	% Preñez
IAC con semen fresco	30404	25204	82,9%
IAL semen congelado	309	245	79,3%
TE	205	148	72,2%

Como fue mencionado en varias ocasiones durante este informe se mantuvieron condiciones de estricta limpieza (esterilidad en procedimientos quirúrgicos) y con temperaturas ambientales controladas. Además los resultados arrojados en este trabajo son muy similares a los obtenidos en años anteriores por la empresa OVITEC.

3.3.1. Inseminación Artificial Intracervical

La obtención y manejo de semen es una parte muy importante de esta tecnología. Diferentes autores mencionan como posibilidades para su extracción a la vagina artificial y el electroeyaculador, donde prefieren a la primera por lo siguiente: su rapidez y limpieza, no es estresante para los sementales, el semen recolectado es de mejor calidad (mejor concentración) y representa mayor bienestar animal (Evans & Maxwell, 1990; Foote, 2002; Aguirre *et al.*, 2005). El tamaño de ella debe de ser el adecuado según la especie, siendo la de carneros más larga (20 x 5.5 cm) que la de los cabros (15 x 5.5cm) (Evans y Maxwell, 1990).

El entrenamiento de carneros se realiza con el propósito de que permitan y aprendan a que se les extraiga semen para las IAC con el uso de la vagina artificial. Esto es de suma importancia, ya que son los carneros reproductores, en los que recae el peso de las IAC de la temporada reproductiva, por lo que la experiencia debe ser placentera, de lo contrario, los

animales no rinden, adquieren traumas y no permitirán la extracción de semen. Es importante realizar el entrenamiento, transporte, esquila, cambio de alimentación o cualquier evento estresante 15-20 días antes de iniciar las colectas para IAC (Gibbons & Cueto, 2007)

Los elementos más importantes son la presión y la temperatura de la VA, ya que son los dos factores necesarios para la eyaculación de los carneros, por lo que se le debe prestar mucha atención e ir conociendo las preferencias de cada individuo (Evans y Maxwell, 1990).

Otro aspecto importante del proceso de entrenamiento es que también se analiza por primera vez el semen de esos reproductores (como parte del entrenamiento del personal dentro del laboratorio) y se verifica su viabilidad como reproductores.

En fin, todo este proceso es para que poco a poco el personal se familiarice con las preferencias de sus sementales facilitando el trabajo en equipo y se asegure un semen de buena calidad y cantidad durante la recolección con vagina artificial (Evans y Maxwell, 1990).

Según Gibbons y Cueto (2007) la frecuencia de extracción de semen de los carneros reproductores está condicionada a cada macho, pero en adultos es habitual conseguir de 2-3 saltos por día, con volúmenes de 0.8 - 1.5 cc y consistencia de cremosa a cremosa-lechosa, por un periodo de 4-5 días y seguido de 2-3 días de descanso.

El volumen por eyaculado para esta especie es de alrededor de 1 ml; el color debe de ser cremoso a cremoso lechoso (Cuadro 2), pero ambos caracteres son variables entre animal y animal; el volumen puede variar incluso por la edad y condición del animal. La presencia de sangre, orina o pus da coloraciones características (rosado, amarillo, verde) y se recomienda desechar el semen (Evans y Maxwell, 1990).

La proporción de machos (marcadores) necesarios para realizar la detección de celos en condiciones de celo natural es de 2% y en hembras sincronizadas de 4% según Evans y Maxwell (1990), mientras que Gibbons y Cueto (2007) mencionan un porcentaje de 8. El utilizado en este trabajo fue de 7%.

En cuanto a los carneros reproductores se debe contar con un número mayor de los necesarios, esto para prever rechazo por baja calidad seminal o incapacidad de eyaculación. Los animales jóvenes se acostumbran mejor y más rápido a la presencia humana y a las instalaciones, lo cual les permite adaptarse más rápido a los entrenamientos (Gibbons & Cueto, 2007).

Todas las muestras de semen fresco extraído con vagina artificial fueron analizadas y dieron calificaciones de 4-5 (Cuadros 1 y 2) por lo que no hubo necesidad de desechar ninguna muestra de semen.

En cuanto a las ovejas, 4 semanas antes del inicio de la IAC se eliminó a las mal nutridas de baja condición corporal ya que a menudo no ovulan o presentan con frecuencia muerte embrionaria. Tampoco debían estar sobrecondicionadas dado que esto conlleva a desórdenes reproductivos (Evans & Maxwell, 1990).

En la finca llamada Punta Delgada el manejo es de tipo extensivo y cuenta con un gran número de animales a ser inseminados. Se realizó IAC en más de 30 mil ovejas por lo que la detección diaria de celos fue vital y la sincronización de celo permitió distribuir los animales en grupos de tamaños manejables para ser inseminados diariamente.

Las instalaciones juegan un papel muy importante en esta parte del trabajo, deben facilitar por medio de divisiones espaciales y mangas fuertes de buena altura, la separación de los animales en celo por un lado y los marcadores por otro. La altura debe ser la adecuada ya que estos animales saltan con facilidad y pueden llegar a mezclarse luego de la separación por parte del personal, lo cual hace que se produzcan demoras e incluso posibles lesiones en los animales (Figuras 30 y 31).



Figuras 30 y 31. Instalaciones adecuadas

Se inseminaron 30,404 ovejas en total, previa detección de celos con carneros marcadores, lo cual era indicativo de manifestación de celo, además presentaron flujos vaginales característicos de esta etapa del ciclo estral. En todas ellas se logró ubicar la apertura cervical y fue fácil la deposición de semen dentro del mismo; las hembras que presentaron problemas (dificultad de introducción de vaginoscopio, pezones amputados, escaso flujo vaginal, mastitis, renqueras, ausencia de varias piezas dentales, condición corporal, etc.) fueron descartadas y no se inseminaron: 123 rechazos en total.

Durante la inseminación artificial si el vaginoscopio no se es retirado un poco antes de depositar la dosis, a la hora de retirarlo crea vacío en cuello uterino y por lo tanto el semen caería en vagina (Evans y Maxwell, 1990).

Según Evans y Maxwell (1990) depositar volúmenes superiores a 0.2 ml dentro del cérvix no ofrece ninguna ventaja ya que rebosaría dentro de la vagina. En el Cuadro 6 se detallan los volúmenes recomendados para la inseminación según la técnica a emplear, los cuales deben contener el número mínimo de EPZ.

Cuadro 6. Volúmenes recomendados para la inseminación según la técnica

Técnica	Tipo de semen	Volumen (ml)	Dosis requerida	Concentración de dosis
IAC	Solo fresco	0.2	Min 100 x 10 ⁶	1000 x 10 ⁶
IA vaginal (IAV)	Solo fresco	0.2-0.5	Min 400 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶
IA uterina transcervical (IAU)	Fresco o congelado	0.5	50-100 x 10 ⁶	200-400 x 10 ⁶
IAL	Fresco o congelado	0.05	20-40 x 10 ⁶	400-800 x 10 ⁶

(Evans y Maxwell, 1990; Gibbons & Cueto, 2007; Youngquist & Threlfall, 2007)

Como norma general se requieren menos EPZ para la IAU que para la IAC y a su vez para la IAV es en la que más cantidad debe introducirse (IAU<IAC<IAV). Independientemente del lugar de deposición del semen, el número de EPZ móviles afecta la fertilidad.

En OVITEC se manejaba que el mínimo a utilizar de EPZ era de 100 millones para IAC (Gibbons & Cueto, 2007). Además, para facilitar el proceso de dilución de semen se utiliza el Cuadro 7:

Cuadro 7. Diluciones

Dilución	Volumen eyaculado/volumen total de dilución							
	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2	2.25
1:1	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5
1:2	1.5	2.25	3	3.75	4.5	5.25	6	6.75
1:3	2	3	4	5	6	7	8	9
1:4	2.5	3.75	5	6.25	7.5	8.75	10	11.25
1:5	3	4.5	6	7.5	9	10.5	12	13.5

(OVITEC, 2011)

La forma que se usó para calcular la dosis con un eyaculado de consistencia cremosa y motilidad masal vigorosa (clasificación 5 en ambas): volumen del eyaculado 1 cc con concentración espermática de 3000 millones (estimada por la consistencia cremosa), con una dosis de inseminación requerida de 100 millones por oveja, nos da un total de 30 ovejas a inseminar (3000 millones/100 millones), a un volumen de 0.03 cc/oveja (1cc de eyaculado/30 ovejas), todo esto respaldado por Gibbons y Cueto (2007).

Diariamente entraron en celo entre 724 y 1402 animales; esto indica que la sincronización de celos con una sola dosis de Pg fue efectiva para este tipo de producciones masivas. De haberse utilizado dos dosis se hubieran concentrado en un mismo día hasta 5000 animales y no se hubiera logrado su inseminación en un mismo día. Esto sumando a que cada inyección de prostaglandina tiene un costo económico, se decidió realizar la sincronización con solo una dosis que permite cierto agrupamiento de animales sin tener un costo demasiado alto, ya que el equipo debía permanecer en la finca por más de 2-3 semanas para completar las IA.

El porcentaje obtenido en este trabajo con la TRA de IAC fue de 82.9%, equivale a 25,204 ovejas. En el siguiente Cuadro (8) se describen resultados reportados por diferentes autores para la misma técnica.

Cuadro 8. Comparación bibliográfica de porcentajes de preñez obtenidos con IAC

Autor	Técnica	% Preñez
Windsor <i>et al.</i> , 1994	IAC	32%
Smith & Murray, 1995	IAC	64%
Parraguez <i>et al.</i> , 2000	IAC	90%

Parraguez *et al.* (2000) reportaron el mayor porcentaje de preñez y el más similar al obtenido en este trabajo, ambos son resultados obtenidos en el sur de Chile, durante época reproductiva, bajos condiciones similares de manejo y ambiente. Por otro lado es el trabajo más reciente (Parraguez *et al.*, 2000), con una diferencia de más 5 años con los demás reportes, lo cual revela que durante este tiempo probablemente se dio un perfeccionamiento de las técnicas empleadas, lo cual permitió obtener mejores resultados.

La excelencia de los resultados obtenidos se puede deber no solo a la buena técnica empleada durante la IA sino a los buenos criterios de selección de animales (detección de animales en celo, animales rechazados, cantidad de marcadores y reproductores, condición corporal, estatus sanitario, entre otros), así como buena calidad, manipulación, dilución y conservación de semen, sincronización de celos, entre otros.

3.3.2. Inseminación Artificial por Laparoscopia

Las ovejas fueron mantenidas en ayuno (comida y agua) por 16 horas antes de realizar la laparoscopia, esto hace que la vejiga y rumen estén bastantes vacíos y permitan una fácil

visualización del útero y se evita la regurgitación de contenido ruminal durante el procedimiento (Evans y Maxwell, 1990).

Se inseminaron un total de 309 ovejas, de las cuales todas presentaron cuernos turgentes y rojizos al momento de la inseminación, indicativo de presencia de celo, lo cual comprueba una buena utilización del protocolo de sincronización de celos y una buena respuesta por parte de las hembras (Mellisho *et al.*, 2006). El porcentaje de preñez obtenido fue de 79,3% (equivale a 245 ovejas), el cual concuerda o supera los diferentes reportes de bibliografías analizadas que se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Comparación bibliográfica de porcentajes de preñez obtenidos con IAL

Autor	Técnica	% Preñez
Windsor <i>et al.</i> , 1994	IAL	48%
Hill <i>et al.</i> , 1998	IAL	72%
Gibbons & Cueto, 2005	IAL	49% (32- 65%)
Mellisho <i>et al.</i> , 2006	IAL	64.7 – 71.4 %
Montero-Caballero, 2011	IAL	66.6-82%

Todo el semen descongelado utilizado para IAL se evaluó bajo el microscopio previa IA para asegurarse de su vitalidad y calidad. Este resultó de muy buena calidad para ser utilizado ya que no hubo necesidad de descarte de ninguna pajilla.

Cuando se utiliza sincronización de celos y como en el caso de este trabajo que se utilizó estimulación de la ovulación artificial, se pudo haber aumentado la fertilidad (hembras preñadas) y la prolificidad (crías/hembra), además de que al utilizar gonadotropinas exógenas

(para estimular la ovulación) se acorta el tiempo que tarda en darse la ovulación y de ahí el posible éxito de esta IATF (Evans & Maxwell, 1990).

3.3.3. Transferencia de Embriones

Los protocolos de superovulación permiten utilizar intensivamente hembras de muy alta genética que en condiciones naturales solo hubieran producido alrededor de 1-2 crías por año (en zonas con estación reproductiva) y un total de 6-8 en su vida reproductiva. Por medio de la TE podemos obtener un alto número de crías en muy poco tiempo (Gibbons & Cueto, 2010). Se debe tener presente el protocolo utilizado (Figura 25) y todos los factores que pueden afectar la subsiguiente respuesta de las donantes (Cuadro 10) al momento de analizar resultados obtenidos.

Las hembras seleccionadas contaban con una buena condición corporal, estado sanitario y era plena época de estación reproductiva; el recurso humano utilizado había realizado este proceso varias veces y sabía cómo manejar los animales para minimizarles el estrés (tanto durante el proceso de superovulación como durante el proceso prequirúrgico) lo cual nos ayuda a minimizar variables.

Gibbons y Cueto (2010) mencionan que el tratamiento más aceptado para provocar ovulación múltiple (OVM) en ovinos es la aplicación de FSH (Folltropin-V®) en dosis decrecientes al final de un tratamiento progestacional (esponjas y/o CIDR) de 14 días. Se prefiere la FSH a la eCG ya que determina una mejor migración espermática (Evans & Armstrong, 1984), mayor tasa de fertilización al utilizar IA (Evans *et al.*, 1984), una mayor producción de embriones (Armstrong *et al.*, 1983; Torres *et al.*, 1987), se debe considerar que

por su corta vida media en sangre se debe aplicar en múltiples ocasiones, 6-8 veces en intervalos de 12 horas (Walker *et al.*, 1986).

Cuadro 10. Factores que intervienen en respuesta a OVM.

Factor	Observación
Factor intrínseco	Se debe tener presente que alrededor de 20 % de hembras no van a responder al tratamiento hormonal
Raza	Las razas que son más prolíficas (ej. Romanov) presentarán mayor respuesta en embriones transferibles y crías nacidas
Estación sexual	Se presentará mayor cantidad de ovulaciones en estación reproductiva
Manejo- Alimentación (Selección de hembras)	Juega un papel fundamental en la respuesta a OVM, en situaciones de subalimentación es probable que ocurran luteólisis prematuras tanto dentro como fuera de la estación sexual.
Presencia Folicular	La respuesta ovulatoria está directamente correlacionada con la cantidad de folículos.
Manejo- Estrés	Al ser sometidas a situaciones estresantes se provoca fallo luteal prematuro.

(Loi *et al.*, 1998; Youngquist & Threlfall, 2007; Gibbons & Cueto, 2010)

Uno de los aspectos fundamentales en el éxito de un programa de TE es la buena sincronía de celos entre donante y receptora, ya que así se ajusta la edad embrionaria a la edad del CL de la receptora. Por ello los tratamientos hormonales deben de ir de la mano, con el fin de que ambas se encuentren en el mismo día del ciclo estral a la hora del lavado embrionario y de la transferencia de los embriones (Gibbons & Cueto, 2010). En la receptoras simplemente se utilizan los mismos protocolos mencionados anteriormente con progestágenos intravaginales, solo que en este caso se mantienen por 14 días (para que vayan junto con las donantes) y una inyección de eCG al retiro del implante.

La fecundación de las donantes puede realizarse mediante MN o IA con semen fresco o congelado (Gibbons & Cueto, 2010). Según Loi *et al.* (1998) con MN los porcentajes de fertilización son bajos, en especial en hembras con más de 10 ovulaciones. Por ello, lo más recomendado es utilizar la IAL, ya que se deposita el semen en los cuernos uterinos y la cercanía al sitio de fertilización permite aumentar el porcentaje de fecundación y disminuir la dosis de inseminación (Cuadro 6). Se debe realizar alrededor de 40-55 horas post retiro de esponja (Loi *et al.*, 1998; Gibbons & Cueto, 2010).

Los lavados para recolección de embriones se realizan al día 7-8 post retiro de esponja, porque los embriones se encuentran en el tercio superior de los cuernos y todavía presentan zona pelúcida intacta (garantía de barrera sanitaria funcional); si se fueran a congelar debe realizarse en estado de mórula o blastocisto (Cuadro 11) (Loi *et al.*, 1998; Bari *et al.*, 2003; Gibbons & Cueto, 2010).

Cuadro 11. Desarrollo embrionario según retiro de esponja

Días post retiro esponja	Estadio embrionario
7	Mórula
8	Mórula compacta o Blastocisto
9	Blastocisto expandido o fuera de zona pelúcida
10	Blastocisto fuera de zona pelúcida

La hora de celo se anotó para que en el momento de realizar la inseminación se siguiera el mismo orden en el que las donantes fueron entrando en celo y posteriormente a la hora de realizar los lavados, se mantuviera ese mismo orden, lo cual además facilita la transferencia de embriones en receptoras (que también fueron separadas por hora de

manifestación de celo) que presentaran la mejor sincronía con las donantes según sus horas de detección de celos.

Se obtuvo un total de 359 estructuras embrionarias de 24 donantes, de estos 323 eran transferibles, para un promedio de 13 embriones transferibles por donante, con un máximo de 25 embriones por oveja y un mínimo de 0. Solo tres donantes dieron cantidades ≤ 3 embriones transferibles, lo cual concuerda con lo reportado en literatura de que un 20% de las hembras tratadas hormonalmente no responden (Gibbons & Cueto, 2010).

De los 323 embriones, se transfirieron 205 de manera individual. La principal razón por la que solo se colocó un embrión por receptora es que los sistemas son de tipo extensivo y las condiciones climáticas y de alimentación no permiten que una hembra logre llevar hasta el destete a dos crías de manera exitosa. El resto de embriones se congelaron para exportación. Un total de 148 receptoras quedaron preñadas para un 72.2% de preñez, lo cual concuerda con lo reportado por la literatura (Cuadro 12):

Cuadro 12. Comparación bibliográfica de porcentajes de preñez obtenidos con TE en fresco

Autor	Técnica	% Preñez
Folch <i>et al.</i> , 2000	TE	66.7%
Alabart <i>et al.</i> , 2003	TE	72.5 %
Gibbons & Cueto, 2005	TE	74%
Gibbons & Cueto, 2010	TE	70%

Gibbons y Cueto (2010) mencionan que antes de iniciar el lavado se debe realizar una determinación de la respuesta ovulatoria, mediante un conteo de los cuerpos lúteos presentes en cada ovario, se puede realizar por laparoscopia o por medio de exteriorización de los

ovarios, esto además permite evaluar la tasa de recolección de embriones, es decir, si hay 15 cuerpos lúteos debería recuperar 15 estructuras a las hora del lavado. En este caso no se realizó este conteo ya que por los muchos años de experiencia del personal se sabe que se cuenta con un porcentaje de recuperación de más del 90% y se prefiere no sobremanipular los ovarios y arriesgar provocar daños transitorios o permanentes.

Es importante que una vez que se haya determinado una buena respuesta al protocolo de superovulación de una donante se verifique la respuesta de la misma oveja a los siguientes tratamientos. Se ha reportado (Alabart *et al.*, 2003) que se puede realizar una vez al año sin descensos significativos en la respuesta ovárica, aunque todavía se espera saber si se puede activar una respuesta inmunológica inducida por el uso de gonadotropinas. Sin embargo se ha demostrado que los efectos secundarios al uso de estas hormonas no es el principal factor limitante sino más bien la generación de adherencias, que imposibilita, o al menos dificulta, lavados subsiguientes (Loi *et al.*, 1998). De las 24 donantes, solo 7 eran por primera vez superovuladas, eso quiere decir que 14 hembras ya habían sido lavadas en al menos una ocasión anterior. Sin embargo ninguna presentó mayor complicación para la exteriorización uterina. La posible explicación a esto es que el uso constante de solución salina con heparina durante todo el tiempo que el útero se encuentra expuesto y su limpieza antes de recolocar dentro de la cavidad abdominal puede disminuir su formación y permitir lavados subsiguientes.

Esta técnica además presenta una ventaja inigualable, dado que permite la comercialización de material genético (embriones) con bajo riesgo sanitario, ya que en los

primeros estadios de su desarrollo presentan una barrera natural contra agentes infecciosos, llamada la zona pelúcida (ZP) (Youngquist & Threlfall, 2007; Gibbons & Cueto, 2010).

Es de suma importancia que a los 15 días de realizado el lavado se destinen las hembras donantes a MN, ya que la preñez y consecuente parto reduce posibilidad de que generen adherencias y que al año siguiente compliquen o hasta imposibiliten su uso como donantes.

Como se ha visto en el trabajo, únicamente las fincas con más años de experiencia y excelentes condiciones de manejo en general e instalaciones son las que utilizan tecnologías más avanzadas y complejas como la TE; algo parecido aplica también, aunque menos riguroso pero sí en cierto grado, con la IAL.

Se debe mencionar una vez más la importancia de llevar registros, es la única herramienta que nos permite evaluar el avance que se ha logrado en el manejo a lo largo de los años, así como para evaluar las condiciones individuales de cada animal (edad, partos, condición corporal, enfermedades, abortos, crías por parto, etc.) y realizar su selección. Para que lo anterior sea efectivo los animales deben estar identificados, en caso contrario se debe iniciar por colocares la numeración (aretes o tatuajes), y es de suma importancia no hacerlo en el mismo momento de la IA o TE sino más bien antes, cuando se realice la selección de animales destinados a los programas de mejoramiento o cuando se va a iniciar el proceso de sincronización.

Lo anterior debe ser aplicado para cualquier otra situación estresante; se debe realizar por lo menos con 1 mes de anticipación. La principal razón es que la reducción del estrés antes, durante y posterior a todos los procedimientos descritos en este trabajo es vital, ya que

situaciones de estrés pueden provocar comprometimiento del crecimiento del ovocito en las hembras por alteración de la P₄ y la secreción de la LH, que además provocan disminución en la secreción de estrógenos y por lo tanto poca manifestación de celo. Además se puede alterar la secreción de FSH, afectando la dinámica durante el ciclo estral, con consecuente detrimento en el desarrollo embrionario y aumento en mortalidad embrionaria (Álvarez, 2008).

Como manejo posterior a las TRA y con el propósito de mejorar los porcentajes obtenidos, lo ideal es destinar a las ovejas inseminadas a mejores potreros. Luego de la detección de preñez, en el último tercio de gestación y en los primeros 2 meses de lactancia es todavía más importante, cuando la demanda nutricional es mayor (Gibbons, 1995); esto se realizó de esta manera sin excepción.

Aun cuando en la Patagonia chilena se destina su producción ovina principalmente a la producción de lana, es importante recalcar que estas técnicas son aplicables en todo tipo de producción sin importar los productos finales, ya que lo que se mejora es genética y por ende la manifestación del potencial productivo de los animales seleccionados.

No se debe olvidar la importancia del papel de educadores que debemos desempeñar como médicos veterinarios, la explicación a los productores y trabajadores de la importancia y metodología de los procesos a realizar. Así se mantiene a los encargados de los animales interesados y llegan a desempeñar una mejor labor (principalmente minimizar condiciones de estrés) y a los productores informados sobre su responsabilidad en la mejora de la gran mayoría de situaciones adversas que se presenten.

La IAC es la forma más económica de difundir el material genético de carneros superiores, ya que no requiere de equipo sofisticado ni costoso; se debe considerar en zonas

donde el manejo reproductivo en la especie ovina apenas inicia, como en Costa Rica, donde todavía no hay cultura ni condiciones (instalaciones, genética, etc.) para invertir grandes cantidades de dinero. Su único inconveniente es el de necesitar carneros de muy alta genética disponibles.

La IAL es muy recomendable para fincas donde haya facilidad de instalación y buenos registros, en especial reproductivos, dado que permite el uso de semen importado de genética mejor y nueva.

La TE es el método más rápido para avanzar en términos de mejoramiento genético pero definitivamente solo puede ser utilizada en fincas donde las condiciones disponibles (manejo nutricional, sanitario y reproductivo; instalaciones y personal) sean excelentes y en donde ya se está implementando de manera exitosa la IA.

4. CONCLUSIONES

Se ganó experiencia en la aplicación de las diferentes técnicas reproductivas asistidas, por medio del uso del equipo especializado mencionado y aprendió a reconocer el importante papel que juega la buena selección de animales reproductores, tanto machos como hembras, con base en las características que se desean mejorar en cada sistema productivo.

Se adquirió destreza en el manejo de material biológico: semen y embriones, así como en el análisis de cada uno de ellos, para poder identificar anomalías y evitar disminuir los porcentajes de preñez al desechar material de mala calidad y obtener por lo tanto mejores resultados.

Se consiguió realizar inseminación artificial intracervical con semen fresco, intrauterina por laparoscopia con semen congelado y recolectar, preservar y transferir embriones frescos.

5. RECOMENDACIONES

Aumentar el tiempo dedicado a rumiantes menores a lo largo de todo el programa de la carrera de Medicina Veterinaria, e incrementar la salida a giras de campo a diferentes fincas con hatos ovinos en el país. Con ello los estudiantes podrán tener una mejor idea del potencial, fortalezas, debilidades y la gran diversidad de estos sistemas productivos.

En cuanto a las TRA, es imperativo entender la importancia de realizar mejoras en el conocimiento de los encargados de los animales, las instalaciones, el manejo nutricional y sanitario, antes de siquiera considerar aplicarlas.

Incrementar la disponibilidad de profesionales debidamente capacitados en el área para así también poder realizar trabajos con las diferentes TRA en los animales de la Escuela y aumentar con ello la participación de los estudiantes en la aplicación de estas técnicas.

Realizar trabajos de investigación para conocer la verdadera situación sanitaria y reproductiva de las ovejas a nivel nacional.

Desarrollar acciones de actualización constante de los médicos veterinarios en el campo de preferencia, incluyendo las TRA en ovinos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, V., R. Vázquez & A. Orihuela. 2005. Training of rams for semen collection by artificial vagina, using as stimulus inanimate objects. *Veterinaria México*. 36: 105-111.
- Alabart, J. L., J. Folch, A. Fernández-Arias, J. P., Ramón, J. M. Garbayo & M. J. Cocero. 2003. Screening of some variables influencing the results of embryo transfer in the ewe. *Theriogenology* 59: 1345-1356.
- Alexander, B., G. Mastromonaco & W.A. King. 2010. Recent advances in reproductive biotechnologies in sheep and goat. *J Vet Sci. Technol.* 1: 101
- Álvarez, E. 2010. Clúster ovino: tras 100 años de historia, nuevos desafíos para el sector. [en línea]. P.10-14. In *Jornadas Ganaderas*. Ago. 19-20. ASOGAMA Chile. www.agenciamagallanes.cl/files/PRESENTACIÓN%20JORNADAS%20GANADERAS.pdf (Consulta: 2 ene. 2012)
- Álvarez, L. 2008. Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. *Arch. Zootec.* 57: 39-59.
- Armstrong, D. T., A. P. Pfitzner, G. M. Warnes & R. F. Seamark. 1983. Superovulation treatment and embryo transfer in Angora goats. *J. Reprod. Fert.* 67: 403-410.
- Bari, F., M. Khalid, W. Haresign, A. Murray & B. Merrell. 2003. Factors affecting the survival of sheep embryo after transfer within a MOET program. *Theriogenology*. 59: 1265-1275.

- Campbell, J.W., T. G. Harvey, M. F. McDonald, & R. I. Sparksman. 1996. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology* 45: 1535-1544.
- Córdova, A., G. Ruiz, J. Lang, J. Saltijeral, J. F. Pérez & T. Degefa. 1999. Induction and synchronization of heat in creole ewes seasonal anestrus with impregnated vaginal sponge impregnated in FGA and Injectable PMSG. *Archivos de Zootecnia*. 48: 437-440.
- Correa, J. E., B. Betgmann & R. Gatica. 1994. Fertilization rate in sheep unilaterally inseminated with frozen semen. *Small Ruminant Research*. 13: 99-101.
- Evans, G. 1991. Application of reproductive technology to the Australian livestock industries. *Reproduction, Fertility and Development*. 3: 627-650.
- Evans, G. & D. T. Armstrong. 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod Fert.* 70: 47-53
- Evans, G., M. K. Holland, H. B. Nottle, P. H. & D. T, Armstrong. 1984. Production of embryos in sheep using FSH preparations and laparoscopic intrauterine insemination. Aust Wool Corp., Canberra.
- Evans, G & W. M. C. Maxwell. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Acribia, Zaragoza, España.
- FAOSTATS. 2010. Livestock and fish primary equivalent. [en línea]. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division.

<http://www.faostat.fao.org/Site/610/Desktop/Default.aspx?Page/ID=610NAncor>.

(Consulta: 3 ene. 2012)

Fernández, A. 2007. Producción ovina quiere engordarse [en línea]. Economía y política. El financiero y capital Financiero. Costa Rica.
http://www.elfinancierocr.com/ef_archivo/2007/agosto/26/economia1202775.html

(Consulta: 1 mar. 2011).

Fierro, S., J. Gil, & J. Olivera. 2005. Sincronización de celos en nuestras condiciones de producción: una opinión. [en línea]. Sitio Argenino de Producción Animal.
http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/30-Sincronizacion.pdf (Consulta: 28 dic. 2011)

Folch, J., J. Olivera, B. Aguilar, J. L. Alabart, P. Sanchez, E. Echegoyen & M. J. Cocero. 2000. Resultados obtenidos en la transferencia de embriones dentro del programa genético de la U.P.R.A. carnes Oviaragon. Reproducción 5 : 25

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. Sección b: situación de los recursos zoogenéticos [en línea]. FAO, USA.
<http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s02.pdf> (Consulta: 28 jul. 2011)

Foote, R. H. 2002. The history of artificial insemination: selected notes and notables. American Society of Animal Science. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, N.Y.

Gibbons, A. & M. I. Cueto. 1995. Trasferencia de embriones en ovinos y caprinos [en línea]. IDIA XXI. INTA EEA Bariloche, Centro Regional Patagonia Norte.

<http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal/reproduc/ct-290.pdf>

(Consulta: 10 ene. 2011)

Gibbons, A. 1995. Manual de inseminación artificial en la especie ovina. INTA, Bariloche, Arg.

Gibbons, A. & M. I. Cueto. 2004. Transferencia de embriones en ovinos. IDIA XXI, INTA Buenos Aires. 4: 79-82.

Gibbons, A. & M. I. Cueto. 2005. Eficiencia de la inseminación artificial con semen congelado en ovinos. INTA, Bariloche, Arg.

Gibbons, A. & M. I. Cueto. 2007. Inseminación artificial con semen fresco en ovinos. INTA EEA, Bariloche, Arg.

Gibbons, A. & Cueto, M. I. 2010. Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos. 2a. ed. INTA Bariloche, Arg.

Gordon, I. 2004. Controlled reproduction in sheep and goats. CAB International, England.

Gordon, I. 2005. Reproductive technologies in farm animals. CAB International, England.

Görlach, A. 1999. Transferencia de embriones en ganado vacuno. Acribia. Zaragoza.

Grazul-Bilska, A. 2010. Assisted Reproductive Technology in Sheep [en línea]. Department of Animal and Range Sciences, North Dakota State University. <http://www.ag.ndsu.edu/HettingerREC/beef/2004-sheep-beef-day-publication/Assisted%20Reproductive%20Technology%20in%20Sheep.pdf> (Consulta: 1 ene. 2011).

- Hill, J. R., J. A. Thompson & N. R. Perkins. 1998. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: a survey. *Theriogenology*. 49: 697-709.
- International Embryo Transfer Society (IETS). 2010. Publications [en línea]: IETS, U.S. <http://www.iets.org/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true> (Consulta: 4 dic. 2011)
- Killeen, I.D. & G. J. Caffrey. 1982. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Australian Veterinary Journal*. 59: 95.
- Loi, P., G. Pbtak, M. Daattena, S. Ledda, S. Naitana & P. Caappai. 1998. Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction. *Repro.Nutr. Dev.* 38: 615-628.
- Latorre, E. & F. Sales. 2010. Inseminacion artificial ovina en la XII Región: I parte. INIA, Chile.
- Leethongdee, S. 2009. Development of trans-cervical artificial insemination in sheep with special reference to anatomy of cervix. *Suranaree J. Sci. Technol.* 17: 57-69.
- Mckusick, B.C., D.L. Thomas, R.G. Gottfredson, R.D. Zelinsky & Y.M. Berger. 1998. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes. P.32-39. In 46th Annual Spooner Sheep Day Proceedings. Ago. 4-7. Estados Unidos.
- Mellisho, E. R. Pinazo, L. Chauca, F. Próspero & V. Rivas. 2006. Inseminación intrauterina vía laparoscópica de ovejas Black Belly con semen congelado. *Rev. Inv Vet. Perú*; 17: 131-136.

Montero-Caballero, D. 2011. Entrevista con el doctor Danilo Montero Caballero. Profesor de la Cátedra Salud Poblacional, Obstetricia y Ginecología. INA. Heredia, C. R. feb. 2011.

ODEPA-INE (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). 2010. Encuesta de ganado ovino 2010 [en línea]. Ministerio de Agricultura, Chile. www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/230611/ovino_10220611.pdf (Consulta: 2 ene. 2012)

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). 2010. Producción pecuaria: informe anual 2005-2010 [en línea]. Ministerio de Agricultura. Chile. www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/200511/pecu_10180511.pdf (Consulta: 2 ene. 2012)

Olivera, J & J. Gil. 2005. Estudio de diferentes alternativas para la sincronización de celos en ovinos: descripción y valorización económica. p. 195-196. In XXXIII Jornadas de Buiatría, Jun. 9-11. Uruguay.

Olivera, J., J. Gil, S. Fierro, A. Araujo, E. Filliol & G. Stoletniy. 2007. Sincronización de celos en ovinos: efecto del intervalo entre dosis de PGF2a y del momento de IA a tiempo fijo con el protocolo Synchrovine®. p.160-162. In XXXV Jornadas de Buiatría. Jun. 7-9. Uruguay.

OVITEC Tecnología y servicios para la ganadería nacional. 2006. Nuestra empresa [en línea]. Austrointernet, Chile. http://www.ovitec.cl/nuestra_empresa.html (Consulta: 5 ene. 2011).

- Parraguez, V. H., O. Blank, C. Muñoz & E. Latorre. 2000. Inseminación artificial en ovinos. *Monografías de Medicina Veterinaria. Chile.* 20: 2
- Pietro, M., G. García, I. Lateulade & M. Villa. 2010. Sincronización de celos en ovinos con doble dosis de prostaglandina. EEA INTA, Arg.
- Porras, A., L. A. Zarco & J. Valencia. 2003. Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Ciencia Veterinaria.* 9: 4.
- Raso, M., O. Buratovich & M. Villa. 2006. Comparación de 4 tratamientos de sincronización de celos en ovino. INTA, Arg.
- Rosa, H. J. D. & M. J. Bryant. 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research.* 48: 155–171.
- Salamon, S., W. M. C. Maxwell & J. H. Firth. 1979. Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Animal Reproduction Science.* 2: 373-385.
- Smith, J. F. & G. R. Murray. 1995. Use of bovine oocytes for the evaluation of the fertility of ram semen. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.* 56: 304-306.
- Torres, S., Y. Cognie & G. Colas. 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH_P. *Theriogenology* 27: 407-418.
- Uribe, L. F., A. Correa-Orozco & J. H. Osorio. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud.* 8:117-131.

- Uribe, L. F., M. I. Lenz & A. M. Loaiza. 2008. Efecto de la sincronización del estro con Prostaglandina-F2 α VS CIDR + 500 UI de eCG en ovejas Bergamacia durante el inicio de la fase luteal. *Revista Científica*. 368 – 373.
- Walker, S. K., D. H. Smith & R. F. Seamark. 1986. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. *Reprod. Fert.* 77: 135-142.
- Wildeus, S. 2000. Current concepts in synchronization of estrus: sheep and goats. *Proceedings of the American Society of Animal Science*. Am. Soc. An Sci. Estados Unidos.
- Windsor, D. P., A. Z. Szell, C. Buschbeck, A. Y. Edward, J. T. B. Milton & R. C. Buckrell. 1994. Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 42: 147-157.
- Youngquist, R. S. & W. R. Threlfall. 2007. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd. ed. Saunders Elsevier, Missouri, U.S.

7. ANEXOS



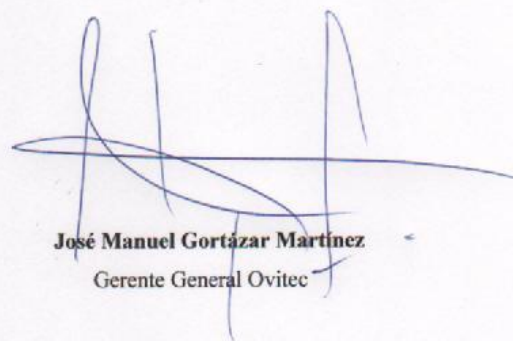
Punta Arenas, 30 de Junio, 2011

A quien interese:

Escribo la presente para confirmar que la señorita Gabriela Pérez Molina realizó su pasantía con nosotros en la empresa Ovitec, con sede en Punta Arenas, Chile. En su tiempo con nosotros, del 30 abril al 30 de junio, participó en las diversas técnicas reproductivas aplicadas a nivel de campo, donde se abarcaron todos los pasos de la extracción y evaluación de semen la IA en fresco, laparoscopia y transferencia de embriones.

Durante el tiempo que trabajó con nosotros su desempeño fue excelente mostrando en todo momento un gran profesionalismo y una muy buena disposición para con todas las actividades y trabajos encomendados. Para todo nuestro equipo fue una grana experiencia compartir y trabajar con ella.

Sinceramente,



José Manuel Gortázar Martínez
Gerente General Ovitec

Casilla 597, Punta Arenas
E- Mail: jgortazar@ovitec.cl

Fonos: 56-61-215497
56-9-3497300