



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“SUPEROVULACIÓN EN VACONAS CRIOLLAS: RELACIÓN DE FOLÍCULOS
PREOVULATORIOS, CUERPOS LÚTEOS Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES”**

Tesis previa a la obtención de
título de Médica Veterinaria.

Autora:

Norma Alejandrina Gordillo Lema.

Director:

Dr. Carlos Alonso Soria Parra.

Cuenca – Ecuador

2015



Resumen

El objetivo de esta investigación fue determinar la relación de las características de los folículos preovulatorios, cuerpos lúteos (CL) con la calidad y cantidad de los embriones obtenidos en vaconas de raza criolla superovuladas. Fueron seleccionadas 10 vaquillas criollas. Para lo cual se aplicó en el día 0 implante intravaginal CIDR®, 2 mg de Benzoato de estradiol y Progesterona 50 mg intramuscular (IM); día 4 se aplicó Folltropin V® (FSH-p) IM en dosis decrecientes, cada 12 h durante 4 días; en el día 6 se retiró el implante, se aplicó dos veces PGF₂α 25 mg IM cada 12 h; el día 8 se inyectó GnRH 0,5 mg IM, se inseminó (IA) 2 veces; mediante ultrasonografía se hizo la medición de folículos preovulatorios en la primera inseminación artificial (IA) a las 10 h de comenzado el celo y luego a las 10 h de la segunda IA, los CL se midieron 7 días pos-inseminación. En el día 15, se colectaron los embriones para su evaluación y clasificación. Para el análisis de las variables número, diámetro de folículos preovulatorios, CL, número y calidad de embriones se utilizó los estadísticos de correlación lineal de Pearson y Tau-b de Kendall. Los resultados obtenidos fueron una media de $7,70 \pm 0,59$ folículos preovulatorios con diámetro de $9,5 \pm 0,19$ mm; $6,80 \pm 0,46$ CL con un diámetro de $15,6 \pm 0,24$ mm; embriones colectados $3,11 \pm 0,80$ por vacona; concluyendo que hubo relación significativa ($p < 0,05$) entre el diámetro del folículo preovulatorio con la calidad de embriones.

Palabras claves: FOLÍCULO PEOVULATORIO, CUERPO LÚTEO, SUPEROVULACIÓN, EMBRIONES, VACONAS CRIOLLAS, ULTRASONOGRAFÍA, SINCRONIZACIÓN, PROTOCOLOS.



Abstract

The objective of this research was to determine the relationship of the characteristics of preovulatory follicles, corpora lutea (CL) with the quality and quantity of the embryos in superovulated race criolla. 10 were selected criolla heifers. On day 0, implant CIDR® intravaginal application, 2 mg estradiol benzoate and progesterone 50mg intramuscular (IM); 4th Folltropin V® (FSH-p) IM applied in decreasing doses every 12 hours for 4 days; on day 6 the implant was removed, was applied twice PGF₂α 25 mg IM every 12 hours; on 8 GnRH injected 0.5 mg IM, inseminated (AI) 2 times; by ultrasound measurement of preovulatory follicles was at first AI at 10 hours of starting the heat and then 10 hours of the second IA, the CL were measured 7 days post-insemination. On day 15 embryos for evaluation and classification I collect. For analysis of the variables number, diameter preovulatory follicles, CL, embryo numbers and quality, was used statistic Pearson linear correlation and Kendall Tau-b. The results were an average of 7.70 ± 0.59 preovulatory follicles with diameter of 9.5 ± 0.19 mm; 6.80 ± 0.46 CL with a diameter of $15.6 \pm 0,24$ mm; 3.11 ± 0.80 embryos collected per heifer; concluding that there was significant relationship ($p < 0.05$) between the diameter of the preovulatory follicle with the quality of embryos.

Keywords: PREEVULATORY FOLLICLE, CORPUS LUTEUM, SUPEROVULATION, EMBRYO, CRIOLLA HEIFERS, ULTRASONOGRAPHY, SYNCHRONIZATION, PROTOCOLS.



Contenido

Resumen.....	2
Abstract	3
Agradecimiento	15
Dedicatoria	16
Introducción.....	17
Revisión bibliográfica	20
Historia de la transferencia de embriones.....	20
Fisiología reproductiva bovina	23
Control neuroendócrino del ciclo estral.	23
Ciclo estral de la hembra bovina.	24
Dinámica folicular.....	25
Cuerpo lúteo.....	28
Selección y manejo de donadoras de embriones	29
Sincronización de la donadora.....	29
Superovulación de la donadora	30
Esquema tradicional de la SOV	32
Protocolos de SOV de la donante.....	33
Manipulación de las ondas foliculares para la superestimulación.....	34
Tratamientos de superovulación.....	35
Progestágenos.	35
FSH.....	36
Gonadotropina coriónica equina	37



Variabilidad de la respuesta superovulatoria 38

Evolución de los esquemas de SOV 39

Resultados de los esquemas de SOV y recuperación de embriones 40

Colección de embriones 40

Desarrollo embrionario 41

 Nomenclatura..... 41

 Factores relacionados con el desarrollo embrionario 44

Tipificación de embriones 44

 Evaluación embrionaria..... 44

Principios de ecografía y sus usos en la reproducción bovina..... 47

 Tejidos Anecogénicos o anecoicos. 47

 Tejidos Ecogénicos o ecoicos. 48

 Tejidos hiperecogénicos o hiperecoicos..... 48

Raza Criolla 48

 Bovino criollo americano. 48

 Características de la raza criolla. 50

 Fenotipo y zoometría del bovino criollo del Ecuador. 50

Materiales y Métodos 52

 Materiales 52

 Materiales de campo: 52

 Área de estudio..... 53

 Técnica para la investigación..... 55

 Unidad de observación..... 55



Características de las vaconas para la investigación.....	55
Adaptación de los animales previo a la investigación.	56
Tratamientos realizados.....	56
Superovulación de las vaconas donantes.....	57
Protocolo de Monitoreo.	58
Colección de embriones.....	59
Valoración de embriones.....	60
Análisis estadísticos.	65
Especificación de las variables a evaluarse.....	65
Resultados	66
Discusión.....	79
Conclusiones.....	83
Bibliografía	84
Anexos	91



Índice de tablas

Tabla 1. Respuesta superovulatoria obtenida con distintas dosis de gonadotrofinas.
..... 38

Tabla 2. Criterios de clasificación para embriones bovinos..... 45

Tabla 3. Clasificación de los embriones de acuerdo a su morfología y calidad..... 46

Tabla 4. Códigos de la fase de desarrollo embrionario. 61

Tabla 5. Estadística descriptiva de las variables. 66

Tabla 6. Estados de desarrollo embrionario y calidad de embriones 70

Tabla 7. Correlación entre el número de folículos preovulatorios y el número de embriones colectados. 72

Tabla 8. Correlación entre diámetro promedio de folículos preovulatorios y número de embriones encontrados..... 73

Tabla 9. Correlación entre el número de CL y el número de embriones 73

Tabla 10. Correlación entre el diámetro de CL y el número de embriones. 74

Tabla 11. Correlación entre número de folículos preovulatorios con la calidad de embriones..... 75

Tabla 12. Correlación entre el diámetro promedio de folículos preovulatorios con calidad de embriones. 76

Tabla 13. Relación entre número de cuerpos lúteos con calidad de embriones. 76

Tabla 14. Correlación entre diámetro de CL con calidad de embriones..... 77

Tabla 15. Correlación entre número folículos preovulatorios y número de CL observados en un proceso de SOV..... 78



Índice de gráficos

Gráfico 1. Representación gráfica del número y porcentaje de estructuras observadas.	67
Gráfico 2. Porcentaje del diámetro de folículos preovulatorios en categorías.	68
Gráfico 3. Porcentaje del diámetro de cuerpos lúteos en categorías.	69
Gráfico 4. Representación en barras la calidad de embriones	71



Índice de figuras

Figura 1. Ondas foliculares: ciclo estral de un bovino con 3 ondas foliculares	26
Figura 2. Esquema de las hormonas del ciclo estral: diferente niveles de las hormonas durante el ciclo estral de la vaca.	27
Figura 3. Desarrollo y tránsito embrionario en el tracto genital: ejemplos de las diferentes etapas que se dan a partir del día 0 (celo) en la vaca.	43
Figura 4. Mapa de ubicación de la parroquia donde se realizó el estudio.	54
Figura 5. Esquema protocolo de SOV y sincronización de la onda folicular	57
Figura 6. Embriones bovinos: ejemplos de estado de desarrollo y calidad.	62
Figura 7. Embriones bovinos: ejemplos de estado de desarrollo y calidad	63
Figura 8. Embriones bovinos: ejemplos de estado de desarrollo y calidad	64



Índice de anexos

Anexo 1. Prueba de normalidad para las variables en estudio.	91
Anexo 2. Protocolo de Superovulación de las vaquillas	92
Anexo 3. Hoja de registro para la medición de los folículos preovulatorios.....	93
Anexo 4. Hoja de registro para la medición de los cuerpos lúteos	94
Anexo 5. Hoja de campo para iniciar el tratamiento SOV.	95
Anexo 6. Ecografías de folículos preovulatorios.....	97
Anexo 7. Ecografías de CL.....	98
Anexo 8. Fotografía de embriones recolectados	99
Anexo 9. Adaptación de animales	100
Anexo 10. Fotos trabajo de campo.....	101



Yo, Norma Alejandrina Gordillo Lema autora de la tesis "SUPEROVULACIÓN EN VACONAS CRIOLLAS: RELACIÓN DE FOLÍCULOS PREEVULATORIOS, CUERPOS LÚTEOS Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médica Veterinaria. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca 9 de septiembre de 2015

Norma Alejandrina Gordillo Lema

C.I: 0302027958



Yo, Norma Alejandrina Gordillo Lema autora de la tesis "SUPEROVULACIÓN EN VACONAS CRIOLLAS: RELACIÓN DE FOLÍCULOS PREEVULATORIOS, CUERPOS LÚTEOS Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Cuenca 9 de septiembre de 2015

A handwritten signature in blue ink, reading 'Norma Gordillo', enclosed in a blue oval.

Norma Alejandrina Gordillo Lema

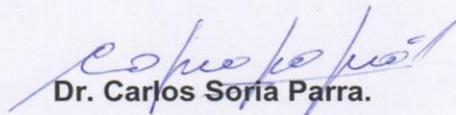
C.I: 0302027958



CERTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación titulado "SUPEROVULACIÓN EN VACONAS CRIOLLAS: RELACIÓN DE FOLÍCULOS PREEVULATORIOS, CUERPOS LÚTEOS Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES", ha sido desarrollado íntegramente por la egresada Norma Alejandrina Gordillo Lema bajo mi dirección, cumpliendo con los requisitos establecidos por la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Cuenca 9 de septiembre de 2015



Dr. Carlos Soria Parra.

DIRECTOR DE TESIS

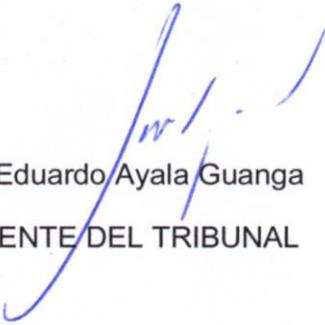


EL TRIBUNAL DE TESIS DE GRADO

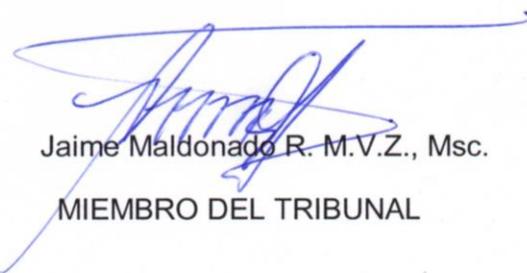
CERTIFICA:

El presente trabajo de investigación titulado "SUPEROVULACIÓN EN VACONAS CRIOLLAS: RELACIÓN DE FOLÍCULOS PREOVULATORIOS, CUERPOS LÚTEOS Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES", realizado por la egresada Norma Alejandrina Gordillo Lema, ha sido revisado correctamente, por lo que queda autorizado para su presentación.

Cuenca 9 de septiembre de 2015



Dr. Luis Eduardo Ayala Guanga
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Jaime Maldonado R. M.V.Z., Msc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Luis Galarza M.V.Z., Msc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Agradecimiento

A la Universidad de Cuenca y a la Facultad de Ciencias Agropecuarias representada por Dr. Manuel Soria.

Al Dr. Carlos Soria por su paciencia y enseñanza en el desarrollo de este trabajo.

A mis padres y hermanos por hacer posible la realización de este gran sueño.

Al Dr. Luis Eduardo Ayala por la voluntad, apoyo e innumerables enseñanzas.

A los miembros del tribunal de grado por el tiempo brindado en la revisión y sustentación de la tesis.

Al Economista Carlos Torres por su ayuda en el análisis estadístico.



Dedicatoria

A Dios por estar siempre a mi lado y permitir la realización de este logro.

A mis padres por ser la razón de mi vida; también a mis hermanos y a todas las personas que estuvieron junto a mí brindándome su apoyo incondicional para alcanzar la meta propuesta.

Norma



Introducción

En la actualidad con el uso de las biotecnologías reproductivas se ha contribuido en el aumento de la productividad y el desarrollo del sector agropecuario, también han sido utilizadas para la conservación, expansión y mejora genética de bovino (Velazquez, 2008). El éxito en los programas de transferencia de embriones (TE) depende en gran medida de la respuesta a la superovulación (SOV) (Motta y *col.*, 2011). El objetivo de la TE es el aumento de la tasa reproductiva de hembras de alto valor genético.

La TE consiste en extraer embriones aun no implantados, del conducto reproductor de la madre (donante), y transferirlo al aparato reproductor de otra hembra (receptora), la cual se encargara de gestarlo y llevarlo al nacimiento; lo anterior implica el uso de hormonas para la SOV y un adecuado manejo de donantes y receptoras (Mejía y Vásquez, 2002).

La SOV es el estímulo hormonal del ovario para aumentar el número de folículos producidos durante el estro, por medio de la aplicación de diferentes tipos de hormonas, entre las cuales se destacan la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Gonadotropina del Suero de Yeguas Preñadas (PMSG). Con esto se permite que las hembras con un alto mérito genético tengan un máximo número de embriones transferibles con una alta posibilidad de producir una preñez (Suárez y *col.*, 2001).

Uno de los principales factores que limitan el éxito de un programa de ovulación múltiple y transferencia embrionaria (MOET) es la gran variabilidad en la respuesta de



las donadoras al tratamiento de superestimulación, lo que se encuentra influenciada por: la especie, raza, edad, el tipo y la dosis de gonadotropina utilizada. A pesar de los diversos estudios realizados en razas foráneas, la respuesta a la superovulación sigue siendo un factor crítico dentro de la industria de la MOET (Ké y col., 1999; Baruselli y col., 2006). En cuanto a la raza considerada criolla de la región centro sur del Ecuador carece de estudios que permitan conocer la relación existente entre las diversas estructuras ováricas y su dinámica folicular, así como la respuesta a la SOV por ello es fundamental obtener información que permita mejorar su eficiencia reproductiva.

Para el presente trabajo de investigación se ha planteado los siguientes objetivos:

Objetivo general.

- ✓ Determinar la relación de las características (tamaño y número) de los folículos preovulatorios, cuerpos lúteos con la calidad y cantidad de los embriones obtenidos en vaconas de raza criolla superovuladas.

Objetivos específicos

- ✓ Cuantificar y describir el diámetro de los folículos preovulatorios y los cuerpos lúteos obtenidos en un proceso de superovulación en vaconas de raza criolla.
- ✓ Establecer la relación entre número, diámetro de los folículos preovulatorios, número, diámetro de CL con la calidad y cantidad de los embriones.



Hipótesis

La calidad y cantidad de los embriones obtenidos en un proceso de superovulación, dependen del número, diámetro de los folículos preovulatorios y de los cuerpos lúteos.



Revisión bibliográfica

Historia de la transferencia de embriones

Las biotecnologías son instrumentos importante que nos ayudan a mejorar la producción animal entre ellas tenemos la IA que ha sido una biotecnología utilizada en mayor medida, en combinación con la criopreservación han contribuido con un desarrollo genético significativo. Tecnologías como la sincronización del estro y el sexado de semen tienden a mejorar la eficiencia de la IA. Así como también la ovulación múltiple y la TE que son técnicas de reproducción artificial permiten el mejoramiento genético, una alta producción y creación de bancos genéticos (Urrego, 2006).

La transferencia de embriones, actualmente es aplicada a casi todas las especies de animales domésticos y a muchas especies de animales salvajes y exóticos e inclusive a la especie humana, mediante la cual los embriones son colectados de una hembra donante y transferidos a una hembra receptora en donde se desarrolla el embrión hasta terminar la gestación; cuya finalidad es la mejora genética, reducir el riesgo de enfermedades y la conservación de especies (Gibbons y Cueto, 2013).

La primera transferencia de embriones la realizó Heape en conejas en 1890 y el primer embrión de bovinos se obtuvo en 1930. En 1951 se hizo el primer trasplante de embriones bovinos con buenos resultados. No obstante, no fue hasta principios de la década del 70 que se despertó el interés comercial en la transferencia (Brito, 1999).



En el Ecuador en 1985 se realizó trasplantes de embriones frescos en ganado vacuno y empezaron a nacer los terneros de este trabajo y en 1987 nacieron dos terneros resultado de la TE congelados (Rosario, 1983).

La tasa de éxito en términos de concepción por transferencia de embriones se encuentra cercano al 60%, incluso con la transferencia de embriones congelados (Cutini y *col.*, 1999). Otros reportes indican promedios que varían entre un 40 a 70% dependiendo del uso de embriones frescos y congelados.

Con el uso de dispositivos que contienen progesterina y otros tratamientos hormonales se puede eliminar por completo la detección de celos en las receptoras. A los 7-8 días después del supuesto celo, aquellas receptoras que poseen un CL, de al menos 15-18 mm de diámetro (determinado a través de ecografía), son transferidas con un embrión (Colazo y Mapletoft, 2007).

En la actualidad se han realizado numerosos estudios sobre la relación entre las estructuras ováricas y la respuesta a la SOV en diferentes razas, dichos resultados son importantes para contrastar con los obtenidos de la presente investigación. A continuación se describen algunos trabajos realizados.

Wolfenson y *col.*, (1994) estudiaron la relación entre el folículo dominante y la cantidad de embriones obtenidos después de un tratamiento superovulatorio, no hubo diferencias significativas en el número de embriones obtenidos o en la calidad de los mismos. En vacas con aspiración del folículo dominante al día 6 y superovuladas desde el día 8 hubo modificaciones significativas en la dinámica folicular; se observó



también un incremento en el número de folículos pequeños, un mayor reclutamiento de folículos medianos y grandes en respuesta al tratamiento. Suárez y *col.*, (2001) compararon la respuesta superovulatoria con la cantidad y calidad de embriones recuperados en vacas Holstein en Bogotá mediante la aplicación de GnRH en el día 6 del ciclo estral antes de iniciar el esquema de SOV, no hubo diferencias significativas en cuanto al número de embriones transferibles entre las vacas tratadas y las no tratadas.

En una investigación realizada en la Universidad Nacional Agraria, ubicada en el departamento de Managua-Nicaragua, tuvo como objetivo conocer la influencia de la raza en la respuesta súperovulatoria en hembras bovinas donantes de las razas Pardo Suizo y Reyna, se utilizaron 10 hembras donantes para cada raza. Se observó que la raza Reyna se comportó mejor que la raza Pardo Suizo al dar mayor cantidad de cuerpos lúteos y embriones. Pero a la vez produjo una mayor cantidad de embriones degenerados y oocitos infértiles (Castro y Espinoza, 2009).



Fisiología reproductiva bovina

Control neuroendócrino del ciclo estral.

El ciclo estral está controlado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero. El hipotálamo produce la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), que estimula la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias, hormona estimulante de los folículos (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Galina y Valencia, 2009; Durán, 2010) cumplen un papel relevante en el control neuroendócrino del ciclo estral (Quintanella y *col.*, 2006).

La FSH es la responsable del inicio de la oleada de crecimiento folicular al estimular su reclutamiento, mientras que la LH interviene en la maduración del folículo dominante y en la ovulación. Estas hormonas son secretadas a la circulación en forma de pulsos y son regulados por 2 sistemas el tónico o generador de pulsos de la GnRH y el cíclico o generador del pico preovulatorio de GnRH. El tónico produce el nivel basal circulante, siempre presente, de hormonas hipofisarias que promueven el desarrollo de los elementos germinales y endocrinos de las gónadas, el sistema cíclico opera más agudamente, siendo evidente su maduración por sólo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos estrales reproductivos de la hembra, tiene por función primaria producir la ovulación (Callejas, 2001).

La neurohipófisis almacena la oxitocina producida en el hipotálamo. Esta tiene varias funciones como las de intervenir en el mecanismo del parto, bajada de la leche, interviene en la luteólisis y transporte espermático (Hafez, 1996).



Los ovarios son glándulas exócrinas (liberan óvulos) y endócrinas (secretan hormonas). Las hormonas producidas son: estrógenos, progesterona (P_4) y la inhibina. Los estrógenos son producidos por el folículo ovárico y tiene acciones sobre las trompas de Falopio, el útero, la vagina, la vulva y el sistema nervioso central, en el cual estimulan la conducta de celo y el hipotálamo donde ejercen un "feed back" negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico (Callejas, 2001).

La P_4 es producida por el CL por acción de la LH. Esta hormona prepara al útero para la implante del embrión y mantiene la gestación (Perry y col., 2007). A nivel hipotalámico ejerce un "feed back" negativo sobre el centro tónico. La inhibina interviene en la regulación de secreción de FSH. Ejerce un "feed back" negativo a nivel hipofisiario, causando una menor secreción de FSH. El útero interviene en la regulación neuroendócrina del ciclo estral mediante la $PGF_{2\alpha}$ que tiene efecto luteolítico (Callejas, 2001).

Ciclo estral de la hembra bovina.

El inicio de las presentaciones de los ciclos estrales ocurre al momento de la pubertad, en donde la hembra bovina entra a un periodo de ciclicidad reproductiva que continua a través de toda su vida, a excepción del periodo de gestación o de balance energético negativo en el cual prevalece el anestro (Sartori y col., 2011; Rivadeneira, 2013).

En la especie bovina el ciclo estral tiene una duración promedio de 21 en vacas y de 20 días en las vaquillonas, considerándose un rango normal entre 18 y 24 días (Palma, 2001; Durán, 2010; Forde y col., 2011).



El ciclo estral comprende de dos fases: 1. Fase folicular o estrogénica dura de 4-6 días (proestro, estro), 2. Fase luteal tiene una duración de 14-18 días (Forde y *col.*, 2011) o progestacional (metaestro, diestro) (Caravaca y *col.*, 2005).

El proestro se caracteriza por un descenso brusco de la progesterona por debajo de 1ng/ml (luteolisis), en el cual comienza el crecimiento y maduración de uno o varios folículos ováricos, conforme los folículos van creciendo hay secreción de hormonas lo cual prepara al aparato reproductor para el estro (Caravaca, et al., 2005).

El estro tiene una duración de 15 a 18h, comienza con la receptividad al macho e involucra todos los cambios que permiten la ovulación y el comienzo de la formación del cuerpo lúteo. La vaca manifiesta inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y pierde el apetito (Callejas, 2001).

En el metaestro hay crecimiento del CL que secreta P₄, la cual es la encargada de mantener la preñez (Caravaca y *col.*, 2005).

El diestro es la fase más larga del ciclo, se caracteriza por el dominio del CL, así como también se estabiliza la producción de P₄ hasta llegar a la fase de meseta (Callejas, 2001).

Dinámica folicular

La dinámica folicular se define como el proceso de crecimiento continuo (Fernández, 2008) y de regresión de folículos antrales que llevan al desarrollo del folículo preovulatorio, figura N° 1. El crecimiento folicular ovárico en la vaca se caracteriza por

tener tres etapas reclutamiento, selección y dominancia (del Valle, 2008). Durante un ciclo estral bovino se dan entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular (Motta y col., 2011).

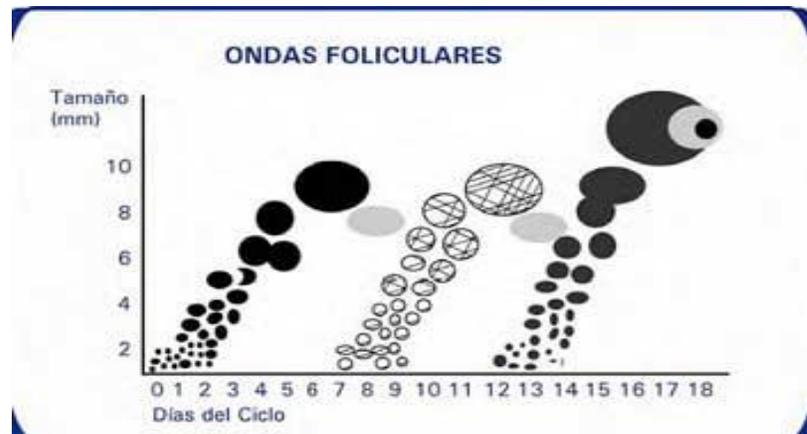


Figura 1. Ondas foliculares: ciclo estral de un bovino con 3 ondas foliculares

Fuente: Canabal, 2007

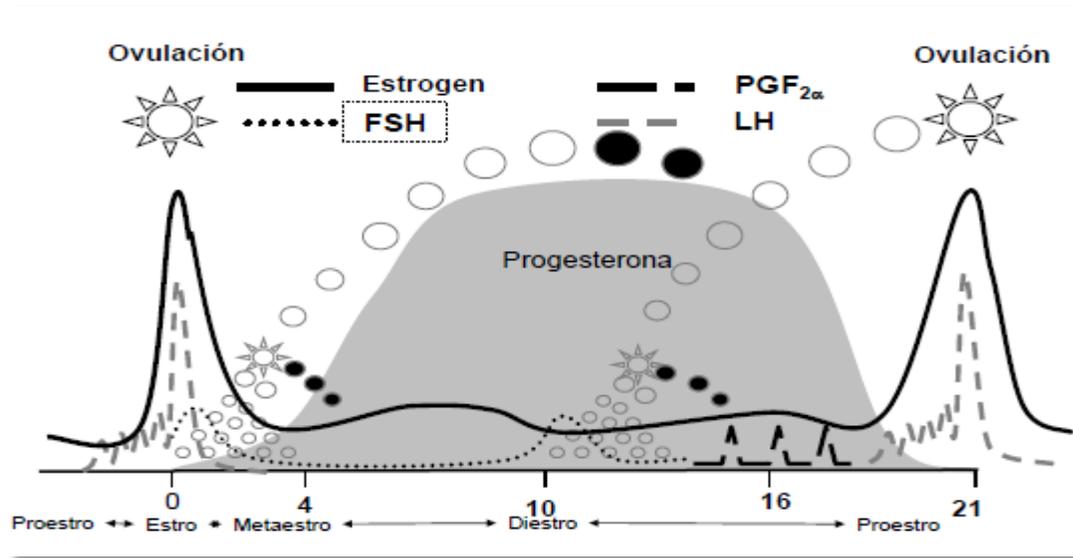


Figura 2. Esquema de las hormonas del ciclo estral: diferente niveles de las hormonas durante el ciclo estral de la vaca.

Fuente: Reppi, 2009

La dinámica folicular en la hembra bovina desencadena los procesos reproductivos y el ciclo estral; sin embargo, estos sucesos están regulados por un complejo conjunto de elementos que se interrelacionan y dan lugar que se presente la ovulación como punto final del ciclo estral (Motta y *col.*, 2011). Para describir la dinámica folicular bovina es necesario definir los siguientes conceptos:

Reclutamiento: Es la etapa en la que una cohorte de folículos (2-3 mm de diámetro) (Paez, 2012) comienza a madurar en un medio con un aporte adecuado de gonadotrofinas que le permiten avanzar hacia la ovulación.

Selección: Es el proceso en el que un folículo evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación (Fernandez, 2008; Reppi, 2009).



Dominancia: Fase en la que el folículo seleccionado dominante ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos (Fortune, 1933). Este folículo alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás, y es responsable de la mayor secreción de estradiol (Lucy, 2007).

La regresión del folículo dominante de las primeras ondas (1 de 2 ondas y 2 de 3 ondas) es causado por la presencia de una baja frecuencia de los pulsos de LH debido a los altos niveles de P_4 , que provocarían una menor síntesis de andrógenos y como consecuencia menor síntesis de estradiol que iniciarían la atresia folicular (Callejas, 2001).

Cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo es un órgano endocrino transitorio, cuya principal función es la producción de P_4 (Lopes y *col.*, 2007; Machado y *col.*, 2012) 2 a 3 día después de la ovulación.

El CL suele presentar tres fases durante su desarrollo. Una primera fase de crecimiento en la que hay un aumento de los niveles circulantes de P_4 . Durante la segunda fase de meseta se registra la máxima producción de P_4 . Por último, si la hembra no queda gestante, el cuerpo lúteo sufrirá regresión por acción de la luteolisina uterina, la $PGF_{2\alpha}$ secretada entre los días 15 y 17 del ciclo estral (del Valle, 2008).



Selección y manejo de donadoras de embriones

En un programa de ovulación múltiple, la selección de donadoras es un proceso de vital importancia debido a que el objetivo principal es aumentar el número de crías genéticamente superiores. En cada donadora debe comprobarse la normalidad del ciclo estral, para ello se deben observarse por lo menos 2 ciclos estrales previos al inicio del programa, además de tener un buen desempeño reproductivo y alta fertilidad esta no deben poseer patologías en el aparato reproductor (Garzón y *col.*, 2007).

El estrés en el manejo de las donadoras es un aspecto importante que se debe considerar, debido al estrés se libera cortisol endógeno, el cual suprime la liberación de LH y por ende la ovulación (Matteri y Moberg, 1982). Si estas hembras no están reproductivamente bien y en un adecuado estado de balance nutricional el programa puede fracasar antes de haber comenzado. Sólo ocasionalmente se deberá trabajar con vacas que carezcan de una óptima historia reproductiva o que tengan algún problema reproductivo determinado. Estos son casos especiales que no siempre se pueden rechazar y en los cuales las probabilidades de éxito son menores. En tales casos se debe prevenir al propietario sobre el mayor riesgo y el animal será tratado con relación con el problema detectado (Palma, 2001).

Sincronización de la donadora

La sincronización se puede realizar 4 semanas posparto, en caso de vacas, siempre y cuando haya un celo natural de referencia pos parto y no presenten ninguna anomalía de tipo ginecológico que las haga rechazables como donantes. Para



concretar la fecha de sincronización nos debemos ajustar lo más posible al ciclo del animal, sin eventos que nos afecten. Así pues los animales que hayan presentado celos muy cercanos en el tiempo (dispersión < 7 días) se dejen y los celos de los animales restantes se sincronizan, ya sea mediante una prolongación del ciclo con progestágenos (dispositivo intravaginal, implantes subcutáneos) o acortando el mismo mediante $\text{PGF}_{2\alpha}$. Es aconsejable administrar GnRH durante el celo para inducir la ovulación o estabilizar el ciclo (Gorlach, 1997).

Superovulación de la donadora

Vélez, Hincapié, y Matamoros, (2009) menciona que la técnica de superovulación consiste en tratar a la hembra con hormonas, lo que ocasiona una ovulación múltiple, y no solamente de uno como normalmente sucede en cada ciclo estral.

Los tratamientos superovulatorios tradicionales, consistían en administrar gonadotrofina coriónica equina (eCG) una sola dosis o dos aplicaciones diarias de extractos de pituitaria conteniendo FSH durante 4 o 5 días (Tribulo y col., 20012).

La variabilidad en la respuesta superovulatoria, el tiempo y el esfuerzo necesario para el tratamiento y la detección del celo han sido problemas limitantes que afectan el éxito de la tecnología de TE (Mapletoft y col., 2002). Aunque el reciente desarrollo de protocolos que permiten el control de la emergencia de la onda folicular y la ovulación no han eliminado la variabilidad a la respuesta superovulatoria, estas técnicas han obtenido un impacto positivo en la TE. Además, con estos protocolos que sincronizan la ovulación se ha eliminado la necesidad de la detección de celo durante



el protocolo de superestimulación permitiendo la inseminación artificial de la donante a tiempo fijo (Mapletoft y col., 2011).

Las diferencias en el comportamiento fisiológico y reproductivo entre animales *Bos indicus* y *Bos taurus* afectan la eficiencia de los protocolos de SOV teniendo un impacto negativo en los programas comerciales de TE; otros factores como el medio ambiente, edad, estado nutricional alteran el tratamiento (Kanuya y col., 1997).

Los esquemas de SOV buscan mejorar las tasas de respuesta en la producción de embriones de calidad excelente y buena (transferibles o congelables), y aumentar las tasas de gestación de los embriones transferidos (Maldonado y Bolívar, 2008).

La SOV en la vaca es un paso muy importante en los procesos de TE. La vaca es un animal monotoco, por lo que generalmente libera solo un óvulo en un ciclo estral. En la SOV se estimula el desarrollo folicular en el ciclo estral. Vacas y novillas que han sido tratadas pueden liberar 10 o más óvulos viables durante un ciclo estral; aproximadamente un 85% de las vacas donadoras fértiles pueden responder a tratamientos de SOV con un promedio de 5 embriones transferibles. Algunas vacas son tratadas repetidamente en un intervalo de 60 días, presentando un decremento en la producción de embriones (Garzón y col., 2007).

Investigaciones revelan una disminución de la respuesta superovulatoria en animales viejos (Vieira, 2009), otras investigaciones encuentran que no hay diferencia en el número de embriones producidos. Entre el 20 a 30% de las donadoras no



producen embriones, otro 20 a 30% responden de forma intermedia y finalmente un 20 a 30% responden bien a los protocolos de SOV. (Motta y *col.*, 2011).

Durante la fase lútea media son comenzados los tratamientos de SOV en el ganado bovino, preferentemente entre los días 8 y 12 después de observado el celo. Este esquema para superovular vacas donantes derivó de experimentos y pruebas de campo realizados durante la década del 70 en el que se concluyó que los tratamientos multiovulatorios comenzados en el día 9 o 10 después de detectarse el celo resultaban en una mejor respuesta que aquellos iniciados antes (día 2 a 6) o después (día 12 a 13). Esto es a causa de que durante el ciclo estral bovino hay 2 o 3 (a veces 4 en la raza Cebú) ondas de desarrollo folicular y en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular, comienza en promedio, entre los días 9 y 10 (7 y 8) (Callejas, 2001).

La SOV y la sincronización no pueden verse como un hecho aislado, éstas se basan en una serie de acontecimientos fisiológicos que abarcan procesos endocrinos desde el ciclo estral hasta la ovulación de los folículos que se han desarrollado en respuesta al tratamiento hormonal suministrado y que son los responsables en gran medida de que la respuesta al tratamiento sea de alta calidad en términos de embriones recuperados y de su calidad (Maldonado y Bolívar, 2008).

Esquema tradicional de la SOV

El esquema de SOV requiere la observación de un celo de referencia; luego, entre los días 9 y 12 del ciclo estral (Mapletoft y *col.*, 2011), se inicia las dos



aplicaciones diarias cada 12 h durante 4 días de dosis decrecientes de FSH; al tercer día de tratamiento se administra una dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$; y al celo inducido por esta, se hace entre dos y tres IA cada 12 h; a más de esto, se aplica una dosis de LH en cada IA; al día 7 u 8 después de la IA se realiza la colección de los embriones. Estudios posteriores sobre el ciclo estral y la fisiología de la dinámica folicular en hembras bovinas permitieron sugerir que el inicio del tratamiento con FSH exógena coincidía con el surgimiento de la segunda oleada de desarrollo folicular (Maldonado y Bolívar, 2008).

Protocolos de SOV de la donante

La SOV consiste en la administración de gonadotrofinas para provocar la estimulación de los ovarios de una hembra donante y estos desarrollen varios folículos, cada folículo contendrá un ovocito maduro que podrá ser fecundado. Por lo tanto la inducción a la superestimulación aumenta la probabilidad de tener más de un embrión.

Existen varios protocolos de SOV de vacas; estos pueden variar en tiempo, cantidad de dosis y al manejo que se le dan. Al aplicar un protocolo se debe hacerlo con responsabilidad y disposición de tiempo, ya que al cometer un simple error se estaría perdiendo todo el tratamiento que se le está suministrando a la vaca.

El protocolo de SOV con prostaglandinas, utiliza el celo de referencia natural, esto es lo que lo diferencia del protocolo anterior. Es decir en este caso el celo no es inducido. El día 0 se palpan las vacas donadoras, las que presentan un CL, se les aplica $\text{PGF}_{2\alpha}$, luego entre los días tres y cinco hay un celo esperado, el cual debe ser



monitoreado, vigilando de cerca el comportamiento de las vacas. En las vacas que fueron tratadas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ se hace otra palpación de CL en el día 14; el día 15 en las vacas que presentaron CL se comienza la aplicación de FSH, se realiza la IA entre los días 19 y 20 y el día 26 se colecta los embriones.

El protocolo de SOV con CIDR[®] (implante intravaginal de P_4), utiliza el celo natural de referencia. Al día 0 se coloca el implante y 2 mL de Benzoato de estradiol (BE) en las vacas donadoras, que presentan un CL definido, luego al día 4 se inician las aplicaciones de FSH (am-pm). En el día 6 se retira el implante, después se realiza la IA en los días 8 y 9. El lavado y la colecta de embriones se hace el día 15 (Orellana y Peralta, 2007).

Manipulación de las ondas foliculares para la superestimulación

Tradicionalmente los protocolos SOV eran comenzados en la fase luteal media del ciclo estral, aproximadamente entre los días 9-11 después del celo, se logró una mayor respuesta superovulatoria. Esto se debe a que en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza en promedio entre los días 9 y 10 del ciclo, esta información se sabe hoy en día por la utilización de ultrasonido, y por eso estaría presente el crecimiento de una nueva cohorte de folículos (Bó y col., 2009). El día de la emergencia de la segunda onda folicular difiere entre individuos y es 1-2 días más tarde en animales con dos ondas que en los de tres ondas. La necesidad de esperar hasta la mitad del ciclo para iniciar los tratamientos superestimuladores implica realizar detección de celos y por eso se presenta un retardo obligatorio. Para obviar esos



problemas, una alternativa es iniciar los tratamientos superovulatorios después de haber sincronizado la emergencia de la onda folicular.

Con el estudio del efecto de hormonas como la FSH, la GnRH, los estrógenos (1-2,5 mg), la P₄ (50 mg) y la LH o la gonadotropina coriónica humana (hCG), se ha logrado evitar el efecto negativo del folículo dominante y así poder iniciar el tratamiento superovulatorio en cualquier etapa del ciclo. La utilización de estas hormonas no solo elimina el efecto de el folículo dominante sino que además permite sincronizar las ondas foliculares, la ovulación y, por ende, se puede inseminar en tiempo fijo (Jiménez, 2009).

Tratamientos de superovulación

Progestágenos.

La P₄ suprime el estro y la ovulación, actuando a través de un mecanismo de retroalimentación negativa sobre la liberación de la LH, por lo mismo probablemente se reduce la frecuencia de los pulsos de esta hormona y se impide que algún folículo ovárico complete su desarrollo y ovule. Al retirar la hormona los folículos de todas aquellas vacas tratadas completaran su desarrollo al mismo tiempo lo que provoca el estro sincronizado. Cuando se aplica progestágenos en un protocolo de SOV este puede dar inicio independientemente de que las donantes se encuentren en fase luteal a diferencia de lo que ocurre con la PGF₂ α , (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Estado de Chiapas, 2006).



Se utilizan dispositivos intravaginales (esponjas) e implantes subcutáneos con progestágenos entre 9 y 11 días, comenzando la aplicación de la FSH 48 h antes de retirar el implante. En los últimos años en programas de sincronización de celo en ganado bovino de carne y leche se han utilizado cada vez más tratamientos con estradiol y P₄. Los tratamientos consisten en la inserción de un dispositivo de liberación de P₄ y en la administración de estradiol el día 0, para sincronizar la emergencia de la onda folicular e impedir el desarrollo de folículos persistentes, en los días 7 u 8 se aplica PGF₂ α y se retira el dispositivo, para asegurar la luteólisis, además 24 h más tarde se aplica una dosis menor de estradiol o GnRH/LH 48 a 54 h después para sincronizar la ovulación. Los productores de leche de todo el mundo utilizaron estos protocolos y obtuvieron tasas entre 35 y 55%. La tasa de preñez en animales sincronizados se ve principalmente afectada por la condición corporal, la producción de leche de las vaca y los días en lactancia (Bó y col., 2008).

FSH

La hormona más utilizada para superovular bovinos es la FSH, la cual puede ser de origen ovino, porcino o bovino. Esta hormona tiene una vida media de 2 a 5 h en el cuerpo, por consiguiente requiere de varias aplicaciones 8 veces por 4 días cada 12 h para lograr su efecto (Illera, 1994; Jiménez, 2009).

En vacas Holstein el esquema estándar de las inyecciones de FSH para la SOV es en total 36 mg, estas son inyectadas en dosis fragmentadas durante 4 días. La dosis



óptima de FSH para la SOV difiere según la raza de la donadora. Las inyecciones deben ser aplicadas entre 8 a 12 horas am y pm (Garzón y *col.*, 2007).

Gonadotropina coriónica equina

Esta hormona también tiene actividad de FSH conocida como la gonadotropina coriónica equina (eCG), antiguamente conocida como gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG). Esta hormona tiene una vida media demasiado larga (persiste en sangre por más de 10 d) y altos contenidos de LH, lo que genera una respuesta exagerada en el crecimiento folicular (Illera, 1994). Para disminuir este efecto, el animal debe ser tratado con una anti-eCG para frenar ese efecto excesivo. A pesar de la ventaja que solo requiere de una aplicación, la utilización de la eCG como hormona superovulatoria no es muy difundida. Sin embargo, la eCG puede ser una alternativa de superovulación en especial en lugares donde no es fácil realizar un protocolo con inyecciones múltiples como el requerido para la FSH (Jiménez, 2009). La dosis utilizada en tratamientos de SOV es de 2000 a 4000 UI de eCG en los días 9 a 14 del ciclo estral. Dosis excesivas de eCG frecuentemente produce quistes foliculares (Garzón y *col.*, 2007).

En un experimento comparando novillas y vacas se encontró que las novillas tienen una mejor respuesta superovulatoria a la eCG que las vacas. El tratamiento consistió en tratar con eCG y anti eCG (Jiménez, 2009).

Variabilidad de la respuesta superovulatoria

El análisis se efectúa en base a lo propuesto por Mapletoft y Murphy, (1987) quienes consideraron por un lado, la variabilidad debida a los tratamientos hormonales y por otro, la variabilidad inherente a la donante y a su medio ambiente (Cabodevila & Torquati, 2001).

Tabla 1. Respuesta superovulatoria obtenida con distintas dosis de gonadotrofinas.

Hormona	Dosis	Obtenidos	Embriones Transferibles	(%)	Referencias
FSH-p	24 mg	12 ± 11	5 ± 6	57 ± 37 ^a	Donaldson (1984b)
	28 mg	15 ± 12	6 ± 6	45 ± 35 ^a	
	38mg	11± 9	5±6	52±34 ^a	
	40mg	12±11	5-6	43±42 ^a	
	50-52 mg	7 ± 7	4 ± 5	47 ± 36 ^a	
	60 mg	7 ± 8	3 ± 4	40 ± 38 ^b	
FSH-p	15 mg	5 ^b	3	55	Pawlyshyn y col. (1986)
	30 mg	19 ^a	6	34	
	45 mg	25 ^a	5	20	
	60 mg	15 ^a	0,2	1	
FSH-p**	5 mg	0,8	0,3	38	Wu y col. (1988a)
	10 mg	6	3	52	
	15 mg	8	3	40	
	20 mg	8	3	41	
	25 mg	8	3	35	
	30 mg	9	3	33	
PMSG	40 mg	6	2	40	Zeitoun y col. (1988)
	1500 UI	3	NR	43	
	3000 UI	5	NR	25	
	6000 UI	3	NR	15	

NR: no registrado; *: equivale a 1050 UI de actividad de FSH como de LH.**: FSH-p con bajo contenido de LH, 20 mg = 35 mg FSH estándar NIH. Todas las FSH-p están expresadas en unidades Armour. Los valores con letras diferentes dentro de una misma columna difieren estadísticamente (p < 0,05)

Fuente: Cabodevila y Torquati, 2001



Evolución de los esquemas de SOV

En la década de los años 90 para la SOV de las donadoras se utilizaba un protocolo sencillo, que consistía en: la detección del celo de referencia, la administración de FSH pura o como PMSG, desde el día 9 hasta el día 12 del ciclo de referencia para la SOV, acompañado de la administración de prostaglandina, la IA al celo observado junto con la aplicación de una fuente de LH para lograr la ovulación y de anti-PMSG, cuando se utilizaba esta hormona como fuente de FSH para inducir la SOV.

A partir del año 2000 se dispone de toda una gama de protocolos de SOV de las donadoras y de sincronización del estro en las receptoras, que han hecho mucho más complejo el tratamiento hormonal de las novillas y de las vacas, han aumentado considerablemente los costos del proceso, representados en la mano de obra, el descarte de cerca de la mitad de las hembras destinadas como receptoras por tener "cuerpo lúteo inapropiado". Todo lo anterior además, de reducir la rentabilidad global del proceso, debido al número elevado de hembras receptoras descartadas en cada ciclo de transferencia, aumenta el periodo abierto de las receptoras, algún porcentaje de estas son descartadas por problemas de fertilidad, pero sin tener datos sobre la consecuencia del tratamiento hormonal. Curiosamente, las tasas de respuesta en términos de embriones de calidad para la transferencia en fresco o la congelación, el porcentaje de gestaciones obtenidas con embriones transferidos en fresco o descongelados, y el porcentaje de terneros nacidos, siguen oscilando alrededor de los promedios obtenidos desde hace más de diez años (Maldonado y Bolívar, 2008).



Resultados de los esquemas de SOV y recuperación de embriones

En Europa se ha conocido importantes variaciones en la tasa de embriones transferibles/año durante los últimos nueve años, en donde se observa que no se ha logrado ningún progreso en cuanto al porcentaje de embriones transferidos. En América del norte se informó una producción promedio de 4.7 embriones para 1980 y 1981, valor similar informado para el período 1978-1982 de un promedio de 5.1 embriones. Además, los investigadores han enfocado sus esfuerzos en métodos que incrementen el número de ovulaciones y de oocitos fertilizados, pero el número de embriones transferibles no ha incrementado en los últimos 20 años. Esta situación permite plantear una serie de cuestionamientos sobre la racionalidad terapéutica y económica de los esquemas de SOV para TE y las posibles causas de las tasas de respuesta en la producción de embriones (Maldonado y Bolívar, 2008).

Colección de embriones

Actualmente la técnica más usada en bovinos en la colección no quirúrgica (transcervical). Esta consiste en la lavar varias veces el cuerno uterino con el medio de colección. Esto se consigue introduciendo el catéter de Foley a través del cérvix hasta la curvatura mayor del cuerno, lugar donde se fija inflando el globo del catéter, el cual se une a la manguera. Por un lado de la bifurcación entra el medio al útero, cada vez que se llena este se le da un masaje, posteriormente se extrae el medio el cual sale hacia el filtro colector de embriones. Una vez lavado un cuerno, se saca el catéter y se repite la operación en el cuerno opuesto. El momento indicado para



realizar la colección es entre el día 6.5 a 7 de iniciado el estro debido al tipo de estructuras que se encuentran en estos días considerando que los embriones pasan del oviducto al cuerno uterino en el cuarto o quinto día. Después de la colección embrionaria las donadoras reciben una inyección de $\text{PGF}_2\alpha$ con el objeto de inducir la regresión de los CL, evitar una posible gestación, incluso múltiple y acortar el periodo entre colecciones (Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Estado de Chiapas, 2006).

Desarrollo embrionario

Nomenclatura.

Después de su liberación, el ovocito es "atrapado" por las fimbrias del *infundibulum* y dirigido al interior del oviducto a través de la actividad ciliar. El ovocito bovino, fertilizado o no, mide de 150-190 μm de diámetro, incluyendo a la zona o membrana pelúcida, una capa a celular glicoproteína de 12 a 15 μm de espesor producida por el ovocito. En la ampolla del oviducto se da la fecundación a partir del contacto entre el espermatozoide y el ovocito, comienza el desarrollo embrionario previo a la nidación del embrión (Neira, 2011). Pocas horas después de la fusión nuclear el cigoto comienza a dividirse. La división nuclear es mitótica y las nuevas células se denominan blastómeros. El desarrollo del embrión hasta los 8 días ocurre dentro de la zona pelúcida. En los primeros 6 días de desarrollo no se manifiesta aumento de tamaño, sólo el incremento del número de blastómeros (Palma, 2001).



La edad del embrión es establecida a partir del día del estro (día 0). Al día 1 le corresponde la ovulación. De esta forma entre 24 y 36 h después de la fertilización el cigoto se divide en 2 células ovas (día 2); 24 h más tarde (día 3) el embrión cuenta ya con 4 células. La división de los blastómeros puede cumplirse en forma asincrónica, razón por la cual es posible observar en estadios tempranos un número impar de células. El intervalo entre la división más temprana y la más tardía es alrededor de 4 h. Hasta el estadio de 8 células (día 4) el cigoto es transportado a través del oviducto. El día 5, aproximadamente, se produce el ingreso al cuerno uterino en estadio de 16 células, momento a partir del cual es posible obtener el embrión en forma no quirúrgica y evaluarlo de acuerdo a su estadio y calidad. El día 5 el cigoto continúa su desarrollo a 32 blastómeros y su forma es similar a la de una mora, razón por la que se lo denomina mórula temprana, donde es posible distinguir individualmente a los blastómeros. Su masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino (Palma, 1993).

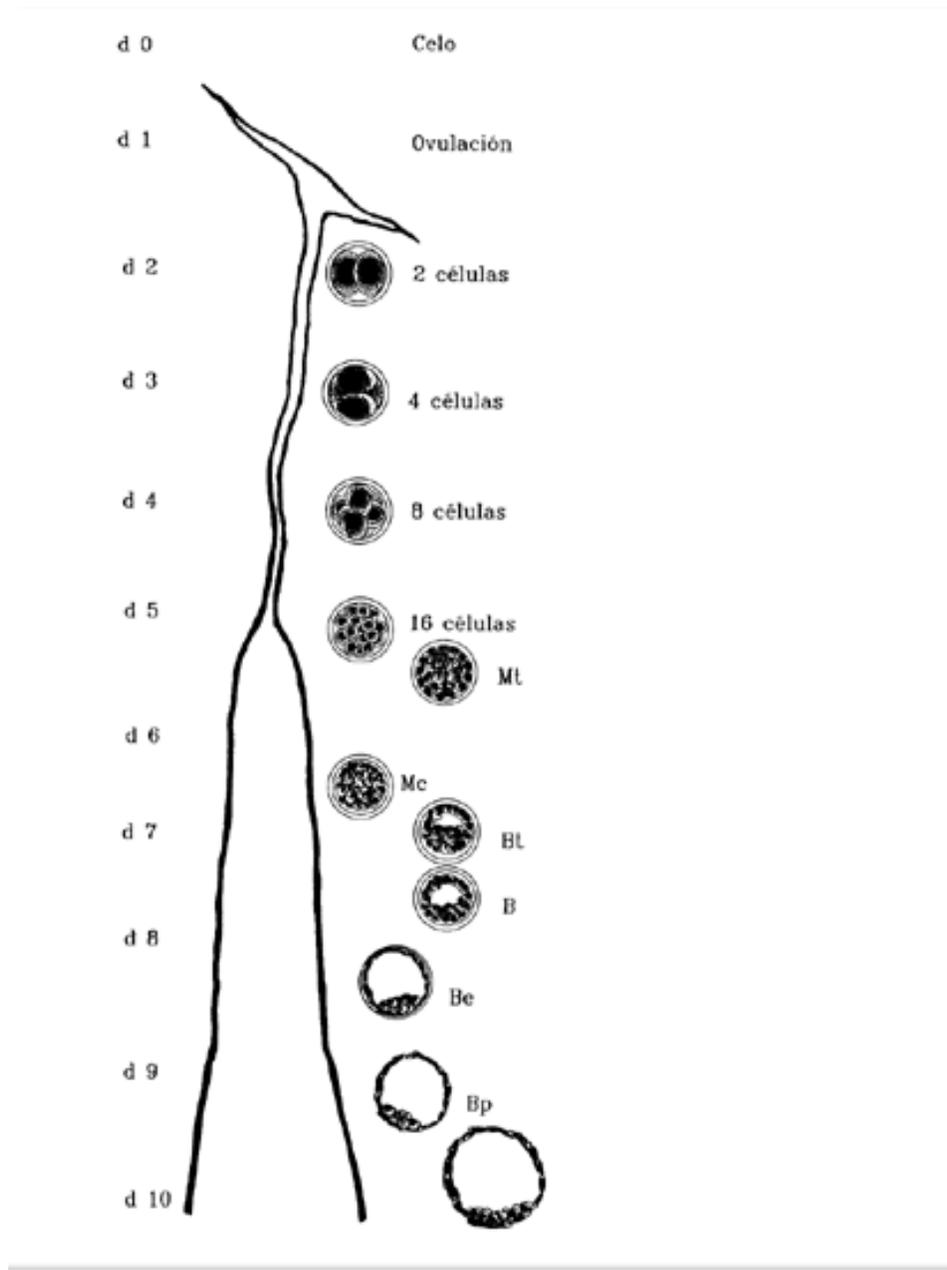


Figura 3. Desarrollo y tránsito embrionario en el tracto genital: ejemplos de las diferentes etapas que se dan a partir del día 0 (celo) en la vaca.

Fuente: Palma, 1993



Factores relacionados con el desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario y el subsiguiente crecimiento fetal abarcan procesos como la proliferación celular, el desarrollo y mantenimiento del CL, las funciones del oviducto y del útero, la implantación y vascularización del embrión, entre otros. El embrión se encuentra encerrado en la zona pelúcida durante los primeros estadios de división celular desde una célula hasta el blastocisto temprano entre los días 7 u 8, donde sus requerimientos para mantenimiento se basan en el piruvato y oxalacetato. En estas primeras etapas previo a la fertilización, hay la presencia de factores de crecimiento (FC) como el transformador alfa (TGF- α), el transformador beta (TGF- β) y el derivado de plaquetas (PDGF), los cuales están implicados en el proceso de desarrollo temprano del ovocito (Tovío, 2008).

Tipificación de embriones

Evaluación embrionaria.

La valoración visual de los embriones no es una ciencia exacta sino una técnica subjetiva utilizada para apreciar un sistema biológico en desarrollo (Gorlach, 1999).

Es importante tener en cuenta el sistema de clasificación embrionario basado en la calidad y el estado de desarrollo del embrión que va a ser transferido, para lograr los mejores resultados de la técnica. A los embriones se clasifica de acuerdo a dos criterios: 1) grado de desarrollo 2) calidad. La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), ha designado un número progresivo para los diferentes estadios



de desarrollo y para la calidad del embrión (Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Estado de Chiapas, 2006).

Tabla 2. Criterios de clasificación para embriones bovinos.

Grado de desarrollo	Clave	Edad del embrión	No. de Células
Óvulo	1		
2 a 16 blastómeros	2	2 - 4 días	2-16
Mórula temprana	3	5 días	> 16
Mórula compacta	4	6 días	32 - 64
Blastocito temprano	5	7 días	160
Blastocito maduro	6	7 días	180
Blastocito expandido	7	8 días	200
Blastocito en eclosión	8	9 días	> 200
Embrión eclosionado	9		

Fuente: (Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Estado de Chiapas, 2006).

Por calidad los embriones se clasifican: Código 1. Excelente o bueno; Código 2. Regular; Código 3. Malo; y Código 4. Muerto / degenerado (Stingfellow y Siedel, 2000).

**Tabla 3. Clasificación de los embriones de acuerdo a su morfología y calidad.**

Calidad del embrión	Clave	Morfología
Excelente	1	Esférico, simétrico, células y color uniformes
Bueno	2	Imperfecciones ligeras, blastómeros extruidos, vesículas.
Pobre o regular	3	Alteraciones más severas, vesículas, células degeneradas.
No transferible	4	Alteraciones graves, signos de degeneración, vesículas.

Fuente: (Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Estado de Chiapas, 2006).

Una vez clasificado los embriones se procede a la criopreservación mediante Nitrógeno líquido a una temperatura cercana a los -196°C . Se puede transferir en fresco sin ser criopreservados los embriones a una hembra receptora seleccionada previo un efectivo control del ciclo estral y en el día 7 post-celo para que coincida con el estado de desarrollo del embrión que va a alojar en el útero (Gorlach, 1999). Los resultados de un programa de TE se ven afectados por la asincronía entre las hembras donante y receptora (Bó y col., 2003).



Principios de ecografía y sus usos en la reproducción bovina

La ecografía o ultrasonografía es una técnica en la que se emplea ondas de sonido de alta frecuencia para producir imágenes de los tejidos blandos y órganos internos, las que se visualizan a través de la pantalla del ecógrafo. La técnica de ecografía en reproducción bovina se ha incrementado cada día por los especialistas en biotecnología de la reproducción bovina, pues su utilización es demandada cada vez más por los ganaderos y los centros científicos, ya que su aplicación confirma o desestima la valoración realizada por palpación rectal (Lazaridis y col., 2012), constituyendo un medio diagnóstico de certeza en la dinámica de las ondas foliculares, desarrollo del cuerpo lúteo, la determinación del estado de gestación precoz, sexado de las crías (Ginther, 2014) y la evaluación de los procesos patológicos del sistema reproductor, entre otros usos.

La ecografía es una técnica de diagnóstico por imagen sobre la base de la emisión de ultrasonidos y la recepción de ecos. Estos ecos se producen por la reflexión de los ultrasonidos a nivel de los distintos tejidos. Cuanto mayor sea la reflexión, mayor intensidad tendrán los ecos, pero menor cantidad de ultrasonidos serán capaces de seguir avanzando y mandar información (Tamayo, 2005).

Tejidos Anecogénicos o anecoicos.

Son estructuras llenas de líquido y se aprecian de color negro, son atravesados por ondas, un ejemplo claro de ello son los folículos (Fernandez, 2012).



Tejidos Ecogénicos o ecoicos.

Estructuras de tejido blando y se aprecian de color gris. Estos tejidos rechazan las ondas (Fernandez, 2012)

Tejidos hiperecogénicos o hiperecoicos.

Corresponden a estructuras óseas y aire y se aprecia de color blanco. Reflejan todos los ultrasonidos (Fernández, 2008).

La ecografía del sistema reproductor de la hembra bovina se realiza por vía rectal; previamente a la introducción de la sonda se debe efectuar una breve exploración rectal con el propósito de conocer la ubicación del útero y de los ovarios. Debemos precisar un buen contacto del transductor con la mucosa rectal para obtener imágenes de mejor calidad.

Raza Criolla

Bovino criollo americano.

El bovino criollo descende de los animales que llegaron en el segundo viaje de Colón en 1493 (FAO-PNUMA, 1981), de los posteriores envíos llegaron a la isla la Española, que hoy es suelo de la Republica Dominicana y Haití. Se difundieron por todo el territorio americano desde centroamérica adaptándose a todos los ambientes (calor, frio, inundaciones, etc.) y por lo tanto generando una variabilidad genética única (Vidal, 2009).



Estos bovinos contribuyeron con el desarrollo económico y cultural de América a través de la provisión de alimento, abrigo y trabajo. El ganado criollo ha sido la base de la ganadería por más de seis siglos en América Latina, ahora se encuentra en fase de ser absorbida por otras razas. La introducción indiscriminada de razas seleccionadas de alta producción de carne y leche, en otros ambientes para desplazar las poblaciones de raza criolla, hace que se origine una variación genética y pérdida de material genético potencialmente valioso (Vidal, 2009).

En reconocimiento de ello se han desarrollado varios programas y proyectos sobre el manejo y conservación del material genético. El ganado criollo que todavía perdura en la mayoría de los países de América Latina, por lo general disperso en núcleos relativamente pequeños, está en manos de ganaderos pequeños de modestos recursos económicos. La capacidad productiva y reproductiva de estos animales se ve afectada debido a que estos sectores proveen al ganado deficiencias en cuanto al manejo, la sanidad y la alimentación. Por la falta de estudios que permitan la valoración de estos, para la utilización estratégica en programas de mejoramiento genético la población actual de bovinos criollos está en riesgo de desaparecer. El uso principal de este interesante biotipo es aprovechar su rusticidad, resistencia al medio ambiente, la fertilidad y la tolerancia a los parásitos (Cevallos, 2012).



Características de la raza criolla.

La raza criolla posee las siguientes características que son: cabeza, huesos y pelos finos; piel negra, rabo descarnado, piel gruesa que le hace resistente a los parásitos, papada prominente, ubre amplia con una buena disposición de cuartos (Vidal, 2009).

Fenotipo y zoometría del bovino criollo del Ecuador.

En la sierra media-alta en la cordillera de los Andes de la Región Sur del Ecuador se encuentran presente 3 fenotipos de bovinos criollos los cuales son: El bovino “Negro Lojano”, animal pequeño, corto, con cuernos, de pelaje negro y largo, con alguna pequeña mancha blanca a nivel de frente, ubre o cañas, es de tipo lechero; el bovino “Encerado”, pequeño, corto, de pelaje gris, con pequeñas manchas de pelos blancos a nivel de diversas partes del cuerpo, por sus medidas morfométricas es un animal de doble propósito tipo leche y carne, y el bovino “Pintado o Cajamarca” que presenta un pelaje amarillo claro a oscuro con zonas de pelos blancos, es un animal pequeño y corto, de doble propósito.

Estos tres fenotipos tienen cualidades notables, como son: elevada capacidad para aprovechar la escasa, dispersa y variada vegetación natural; alto instinto materno; excepcional resistencia y una menor exigencia en la tecnificación de las condiciones de manejo (Aguirre y *col.*, 2011)

Vidal en el 2009 menciona que el bovino Pizán tiene una estatura media, posee una adaptación a las alturas andinas, es dócil y a la vez rústico; además tiene una



notable capacidad de asimilación de todo alimento es resistente a enfermedades: bronco-pulmonares, mastitis y panadizo (Vidal, 2009).

De lo antes mencionado se puede decir que estas son las razas criollas de mayor pureza en nuestro país, sin embargo para nuestro estudio se tomaron bovinos criollos del páramo, que han sido sometidos a un proceso de adaptación observando que la mayoría de ellos presentan características similares a las antes mencionadas. En cuanto a su genética estos proceden de cruzas entre razas de bovinos introducidos y criollos, ya que no existe una raza criolla propia de nuestro país., sin embargo se están desarrollando proyectos de investigación que permitan obtener una raza criolla propia del Ecuador y así conservar como patrimonio genético.



Materiales y Métodos

Materiales

Materiales de campo:

Biológicos:

Vaconas criollas

Semen

Físicos:

Ecógrafo Aloka Prosound 2

Sonda lineal de 7,5 MHz

Estereoscopio

Placa térmica

Computadora

Ropa de Trabajo

Equipos para el manejo de los animales

Guantes de tacto

Hojas de campo

Jeringas descartables

Agujas descartables

Sonda Foley

Tubo en y

Mandril o estilete

Norma Alejandrina Gordillo Lema.



Filtro para embriones bovinos

Micro filtró

Cajas Petri cuadrículada

Pipetas

Micro pipetas

Pajuelas

Tapones

Materiales químicos.

Progestágeno

Benzoato de Estradiol

Prostaglandina

Anestésico lidocaína

Implantes (Progesterona 1,9 g)

Gel (carboximetilcelulosa,)

Medios lavado PBS (solución salina de fosfatos buferada)

GNRH

FSHp

Área de estudio

La presente investigación fue desarrollada en la granja de Irquis de la Universidad de Cuenca, provincia del Azuay; cantón Cuenca, parroquia Victoria del

Norma Alejandrina Gordillo Lema.

Portete, en el Km 23 vía Girón a 2.714 msnm, con una temperatura promedio de 8°C, humedad relativa del 80% y pluviosidad de 800mm a 2.000mm.



Figura 4. Mapa de ubicación de la parroquia donde se realizó el estudio.

Fuente: IGM - INEC



Técnica para la investigación

Unidad de observación.

Se utilizaron 10 vaconas de raza criolla con una edad promedio de $19,9 \pm 4,8$ meses, con una condición corporal de $2,5 \pm 0,4$ en escala de 1 a 5 y un peso promedio de $243,3 \pm 45,0$ kg. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

Criterios de inclusión.

Vaconas de raza criolla

Condición corporal de $2,5 \pm 0,4$

Edad de $19,9 \pm 4,8$ meses

Nulíparas

Ciclos estrales regulares

Criterios de exclusión.

Animales con problemas reproductivos

Enfermas

Características de las vaconas para la investigación.

Previo al inicio de la investigación se procedió a monitorear ecográficamente a las vaconas, a fin de evaluar los ovarios para verificar de que no exista ninguna patología (quistes ováricos, cuerpos lúteos cavitarios); de la misma manera se evaluaron los



cuernos uterinos para descartar patologías como metritis, piómetra, así como también en el cérvix y en la vagina para constatar patologías ligadas a estas.

Adaptación de los animales previo a la investigación.

Una vez seleccionadas las vaconas se realizó un proceso de adaptación en el manejo (cerca eléctrica) y la alimentación y de tal forma que los animales ingresen a la investigación en iguales condiciones. Estas fueron alimentadas con pastura (mezcla forrajera kikuyo, ray grass, trébol rojo y blanco), suplementadas con heno de pastura y sales minerales y agua *ad libitum*.

Tratamientos realizados.

A las 10 vaconas se aplicó lo siguiente.

1 Sincronización de la onda folicular: con progesterona y benzoato de estradiol.

2 Superovulación: Con FSH con una condición previa que las vaconas deben estar sincronizadas

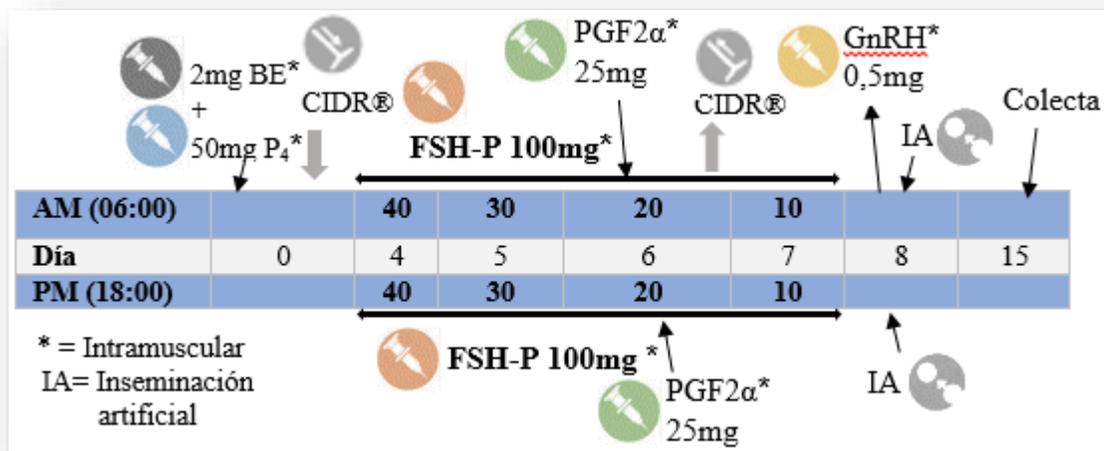


Figura 5. Esquema protocolo de SOV y sincronización de la onda folicular

Fuente: Autora.

Superovulación de las vaconas donantes

Una vez alcanzada la pubertad determinada por presencia de celo y cuerpo lúteo observado por Ultrasonografía (US), se comenzaron los tratamientos de SOV que consistieron en aplicación (día 0) de un implante intravaginal de P₄ 1,9 g (P₄- CIDR®, Pfizer SA), 2 mg de Benzoato de estradiol (Grafoleon®, Life) y 50 mg de P₄ vía IM (Progestar®, IMVAB, Cia Ltda.); día 4: FSH (Folltropin V®, Bioniche) 40 mg 6 am y 40 mg 6 pm, vía IM; día 5: FSH 30 mg 6 am y 30 mg 6 pm, vía IM; día 6: FSH 20 mg más 25 mg de PGF₂α (Lutalise®, Zoetis) y se retiró el implante 6 am y FSH 20 mg más 25 mg de PGF₂α 6 pm, vía IM; día 7: FSH 10 mg 6 am y 10 mg 6 pm, vía IM; día 8: se realizó la primera inseminación previa aplicación de GnRH (Fertagyl®, Intervet) 0,5 mg 6 am, vía IM y una segunda inseminación 6 pm, y el día 15, se colectó los embriones para su posterior evaluación y clasificación.



Protocolo de Monitoreo.

Se realizó mediante ultrasonografía, para ello se utilizó un ecógrafo marca Aloka Prosound 2, multifrecuencia, provisto de un transductor lineal (7,5 MHz). Las estructuras a observar fueron los ovarios: derecho e izquierdo de cada animal. Las ecografías se realizaron mediante el siguiente protocolo.

1. Ingreso de las vaquillas a la manga
2. Sujeción de los animales en el collarín
3. Preparación del ecógrafo
4. Colocación de un protector en la sonda (guante con gel)
5. Calibración del ultrasonógrafo
6. Introducción del guante veterinario ginecológico
7. Lubricación del guante a utilizar
8. Introducción del brazo en el recto del animal
9. Evacuación de las heces
10. Localización del cérvix, útero, cuernos y ovarios
11. Introducción de la sonda al lugar del examen
12. Contacto del transductor con el ovario derecho indirectamente vía rectal
 - a. Toma dorsal del ovario
 - b. Corte transversal
 - c. Toma de medidas de los folículos y cuerpo lúteo en cada corte
13. Contacto del transductor con el ovario izquierdo indirectamente vía rectal.
 - a. Toma dorsal del ovario
 - b. Corte transversal



- c. Toma de medidas de los folículos y cuerpo lúteo en cada corte
14. Almacenamiento de la información en la memoria del ecógrafo y en el USB
(De Universal Serial Bus)
15. Retiro del transductor del recto del animal
16. Salida del animal de la manga

Monitoreo de los folículos preovulatorios.

En el día 8 del tratamiento superovulatorio a las 10 horas de iniciado el celo en la primera IA se contabilizaron los folículos ≥ 8 mm de diámetro, tanto del ovario derecho como del izquierdo.; la siguiente medición se hizo a las 10 horas de haber realizado la segunda IA a los folículos ≥ 8 mm de diámetro. La información obtenida fue almacenada en la memoria del ecógrafo y en un dispositivo de almacenamiento externo, también se registró en hojas de campo individuales para su respectivo análisis.

Monitoreo de los cuerpos lúteos.

Se realizó una ecografía de los ovarios 7 días posteriores a la IA o en el día 15 del protocolo SOV antes de la colección de embriones, se contabilizó el número y diámetro de los CL, la información fue almacenada de igual forma que para los folículos.

Colección de embriones.

La colecta de embriones se realizó 7 días después de la primera inseminación precedida por una evaluación ecográfica de los cuerpos lúteos existentes. Para la



colecta se aplicó el siguiente protocolo: limpieza de la región perineal, aplicación de anestesia peridural Lidocaína 100 mg (Xilocaína 2% LABETEC®) y la colecta propiamente dicha usando una sonda tipo Foley (Vortech™ Silicone Catheter Syringe Flush; AGTECH Inc) comenzando en el cuerno uterino correspondiente al ovario con mayor número de cuerpos lúteos. El lavaje se hizo con 500 ml de PBS por cada cuerno uterino, el PBS se recuperó en un filtro tipo EMCON (ZONA™ embryo collection filter, Agtech Inc) y fue trasladado al laboratorio para la observación del material recogido. El líquido colectado se colocó en una caja Petri cuadrículada y por medio de un estereoscopio se identificaron los embriones, se trasladaron a una caja Petri pequeña con medio de mantenimiento (Emcare Holding Solution, AGTECH Inc) para lavarlos y proceder a la valoración.

Valoración de embriones.

Una vez ubicados a los embriones y colocados en un medio nutritivo (holding), se procedió a valorar de manera cuantitativa y cualitativa a los embriones de acuerdo a los parámetros de calificación de la “Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones” (I. E.T. S) la que se indica en la tabla 3 y 4.



Tabla 4. Códigos de la fase de desarrollo embrionario.

Nº	Estado
1	No fecundado
2	Dos a doce células
3	Mórula temprana
4	Mórula
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto eclosionado
9	Blastocisto eclosionado y expandido

Fuente: (Stingfellow & Siedel, 2000)

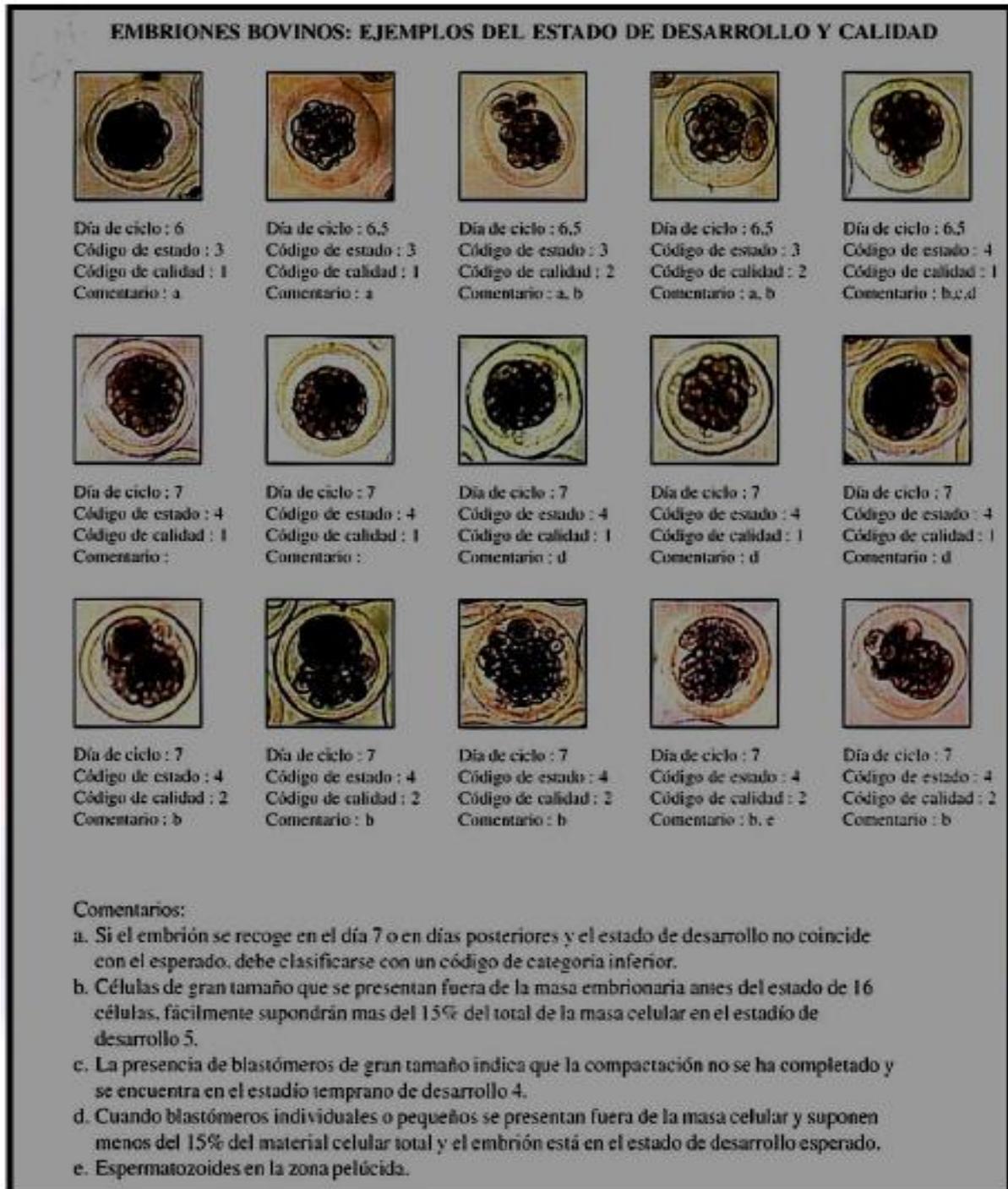


Figura 6.Embriones bovinos: ejemplos de estado de desarrollo y calidad.

Fuente: Stingfellow y Siedel, 2000

Norma Alejandrina Gordillo Lema.

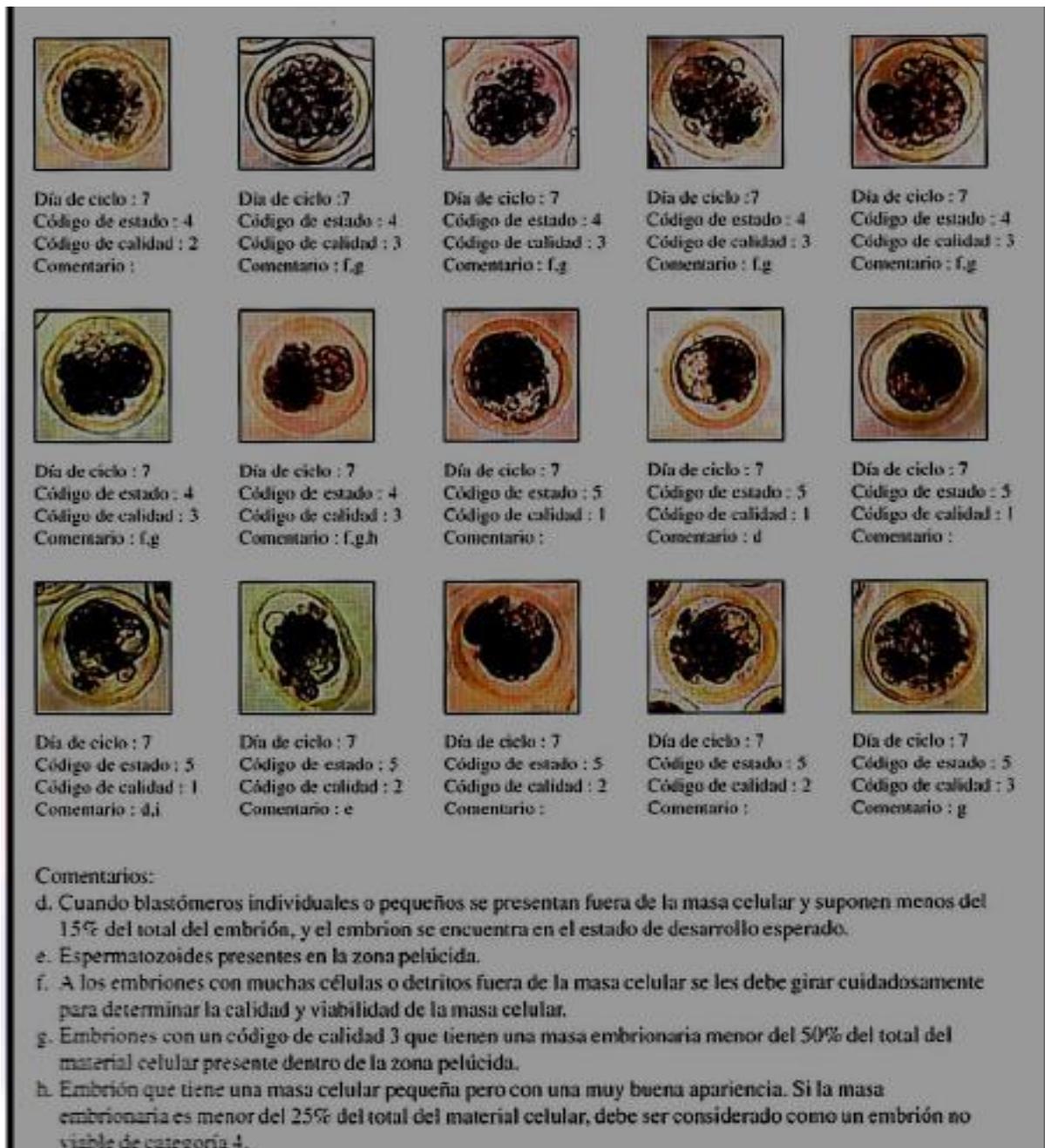


Figura 7. Embriones bovinos: ejemplos de estado de desarrollo y calidad

Fuente: Stingfellow y Siedel, 2000



Figura 8. Embriones bovinos: ejemplos de estado de desarrollo y calidad

Fuente: Stingfellow y Siedel, 2000



Análisis estadísticos.

Para evaluar los datos se utilizó el programa IBM® SPSS® 22, en el cual se realizaron las pruebas de supuestos de normalidad, y luego correlaciones de Pearson para relacionar las variables número, tamaño de folículos preovulatorios y CL con número de embriones y estadística de Tau-b de Kendall para establecer relación de número, tamaño de folículos preovulatorios y CL con calidad de embriones.

Mediante estadísticos descriptivos se obtuvo, número, medias, porcentajes de las siguientes variables: número, tamaño de folículos preovulatorios, CL, embriones y calidad de los mismos.

Todas las pruebas fueron realizadas al 5% de significancia.

Especificación de las variables a evaluarse

Independiente: Diámetros de folículos preovulatorios, número de folículos preovulatorios, diámetros de cuerpos lúteos y número de cuerpos lúteos.

Dependientes: Calidad de embriones (Excelente CI, Bueno CII, Regular CIII, Malo IV) y número de embriones.

Resultados

Resumen estadístico de las variables en estudio

Al realizar las tabulaciones de los datos registrados en cuanto a la presencia de los folículos preovulatorios y CL en los ovarios derecho e izquierdo , así como también la presencia de total de estructuras y embriones obtenidos pos tratamiento superovulatorio, se obtuvo los siguientes resultados

Tabla 5. Estadística descriptiva de las variables.

Variabes	N total de estructuras	Media	Error estándar	Mediana	Mín.	Máx.
Número de folículos preovulatorios	77	7,70	0,59	7,50	5	11
Diámetro de folículos preovulatorios (mm)	-	9,49	0,19	9	8	15
Número de CL	68	6,80	0,46	7	5	10
Diámetro de CL (mm)	-	15,6	0,24	15,5	12,5	21,0
Número de estructuras embrionarias	34	4,94	0,34	5	1	7
Número de embriones	28	3,11	0,80	2	1	7

Fuente: Autora.

En este trabajo se encontró un total de 77 folículos preovulatorios posterior al tratamiento en las 10 vaconas, con un diámetro promedio de $9,5 \pm 0,19$ mm y una media de $7,70 \pm 0,59$ folículos preovulatorios por animal, así como también obtuvimos una media de $6,80 \pm 0,46$ CL con un diámetro promedio de $15,6 \pm 0,24$ mm de un total de 68, además encontramos un promedio de $3,11 \pm 0,80$ embriones por vacona lavada, colectando un mínimo de 1 embrión y un máximo de 7.

Por lo tanto se podría decir que el 88,31% de folículos observados ovularon, generando 68 CL, y de estos tan solo el 50% dieron lugar a 34 estructuras de las cuales 28 fueron embriones.

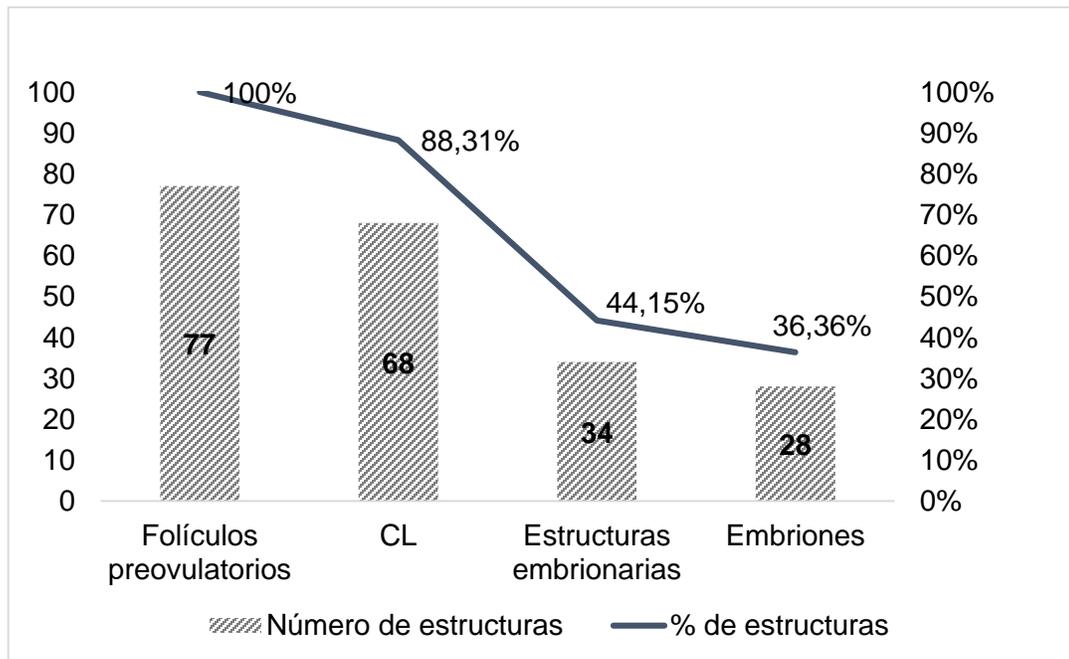


Gráfico 1. Representación gráfica del número y porcentaje de estructuras observadas.

Fuente: Autora.

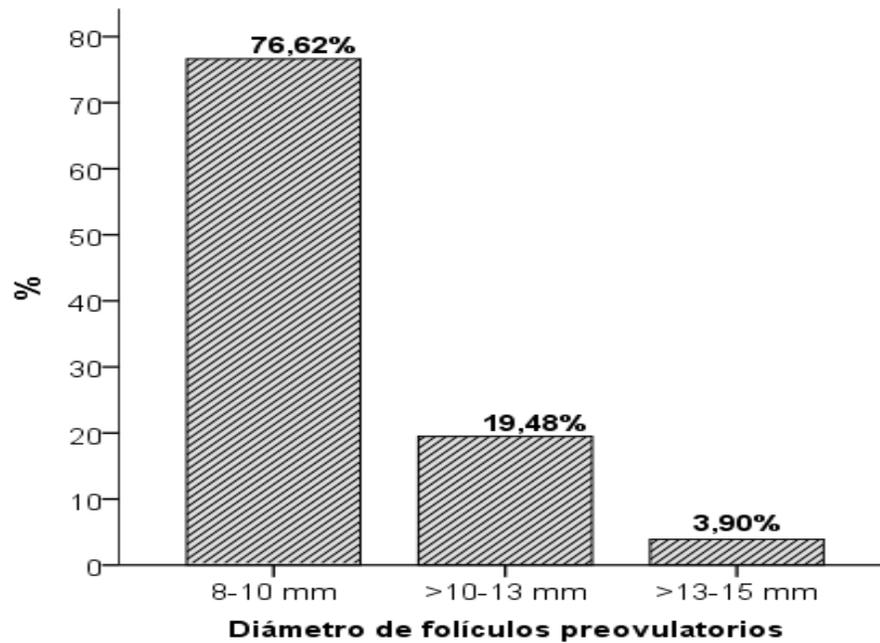


Gráfico 2. Porcentaje del diámetro de folículos preovulatorios en categorías.

Fuente: Autora.

Al agrupar los diámetros de los folículos preovulatorios en 3 categorías (IC 8-10, >10-13 y CII >13-15mm); se encontró lo siguiente: que el 76,62% de folículos preovulatorios estaban en la IC, 19,48% en la IIC y 3,90% en la IIIC.

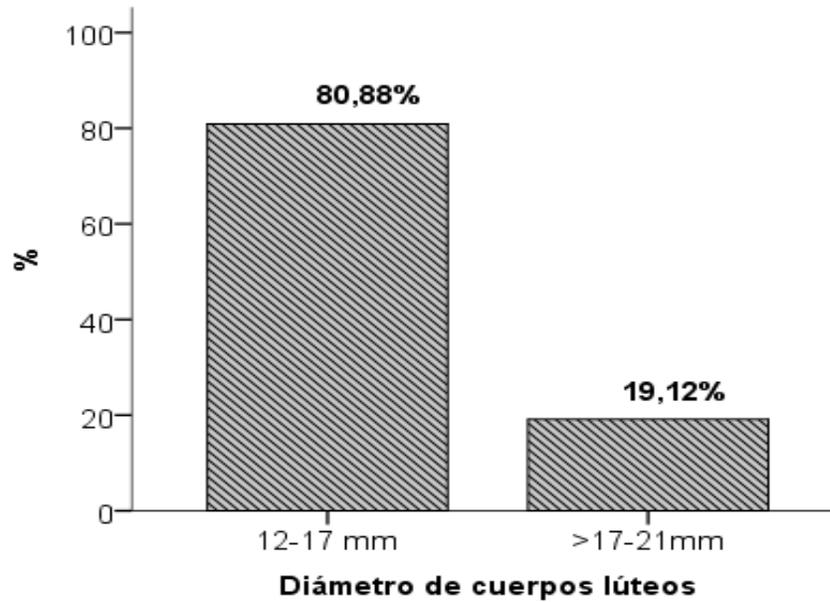


Gráfico 3. Porcentaje del diámetro de cuerpos lúteos en categorías.

Fuente: Autora.

Se categorizo el diámetro de CL de la siguiente manera (IC 12-17, IIC > 17-21mm), la cual dio lugar que el 80,88% de CL estaban en la IC y el 19,12% en la IIC.

**Resumen del total de embriones encontrados después de la colecta.****Tabla 6. Estados de desarrollo embrionario y calidad de embriones**

Estados de desarrollo embrionario	Calidad de embriones				
	Excelente	Regular	Muerto o degenerado	Total	
2-12 células	N	---	--	2	2
	%	---	0,0%	25,0%	7,1%
Mórula	N	8	2	6	16
	%	44,4%	---	75%	57,1%
Blastocisto temprano	N	2	---	---	2
	%	11,1%	---	---	7,1%
Blastocisto	N	5	---	---	5
	%	27,8%	---	---	17,9%
Blastocisto expandido	N	3	0	0	3
	%	16,7%	---	---	10,7%
Total	N	18	2	8	28
	%	100%	100%	100%	100%

Fuente: Autora.

De un total de 28 embriones colectados de las 10 vaconas tratadas, encontramos que 16 (57,1%) fueron mórulas de las cuales 8 se calificaron de excelente calidad, 2 regulares y 6 muertas; 5 (17,9%) blastocistos, 3 (10,7%) blastocistos expandidos, 2 (7,1%) blastocistos tempranos excelentes y 2(7,1%) de 2-12 células muertas, siendo esto como consecuencia del día de colección.

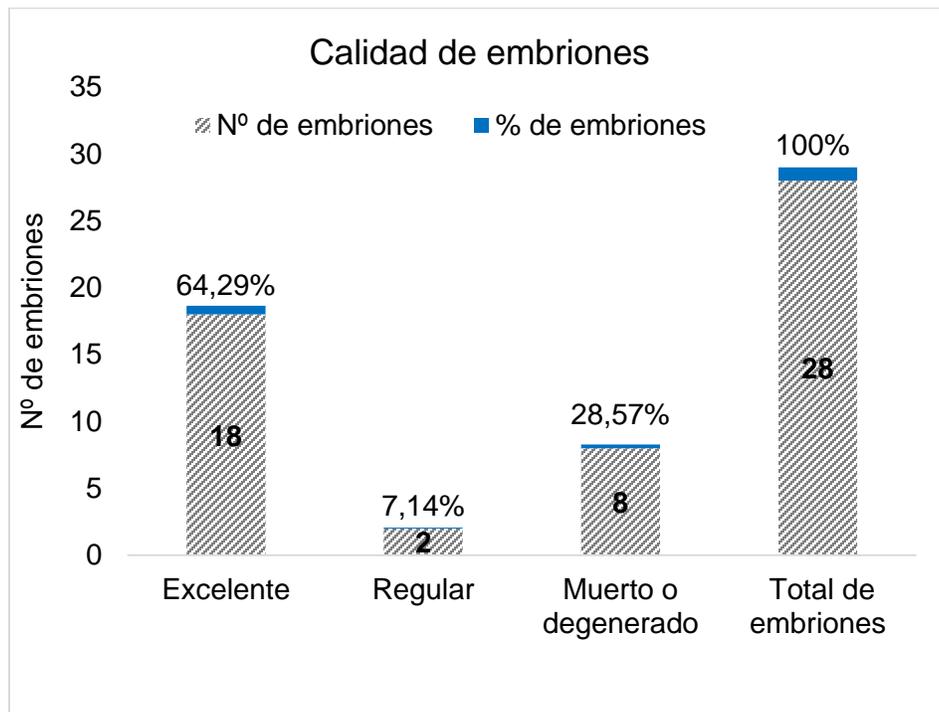


Gráfico 4. Representación en barras la calidad de embriones

Fuente: Autora.

Se obtuvo el 64,29% de embriones de excelente calidad de un total de 28 embriones, el 28,57% muerto y un 7,14% fueron embriones regulares.

**Análisis estadístico de las variables estudiadas.**

Coeficiente de correlación de Pearson entre número de folículos preovulatorios, con el número de embriones.

Tabla 7. Correlación entre el número de folículos preovulatorios y el número de embriones colectados.

Número de folículos preovulatorios - Número de embriones	Estadístico de Pearson	0,417
	Valor p 0,05	0,264
	Datos	9*

*9 se refiere a los pares de datos estudiados y no al número de vaconas (10).

Fuente: Autora.

La correlación de Pearson entre el número de folículos preovulatorios y el número de embriones ($r = 0,417$) señala que se trata de una correlación moderada y que a mayor número de folículos preovulatorios en un proceso de SOV mayor número de embriones colectados; sin embargo $p > 0,05$ indica que no es significativo estadísticamente, y de acuerdo a este valor p , esta correlación podría cambiar en un nuevo proceso muestral.



Tabla 8. Correlación entre diámetro promedio de folículos preovulatorios y número de embriones encontrados.

Diámetro promedio de folículos preovulatorios - Número de embriones	Estadístico de Pearson	0,063
	Valor p 0,05	0,863
	Datos	9*

*9 se refiere a los pares de datos estudiados y no al número de vaconas (10).

Fuente: Autora.

El coeficiente de correlación $r = 0.063$, indica que existe una relación débil entre la variable diámetro de folículos preovulatorios y el número de embriones, el valor $p > 0,05$ indica que no es significativo estadísticamente.

Tabla 9. Correlación entre el número de CL y el número de embriones

Número de CL - Número de embriones	Estadístico de Pearson	0,146
	Valor p 0,05	0,708
	Datos	9*

*9 se refiere a los pares de datos estudiados y no al número de vaconas (10).

Fuente: Autora.



No existe correlación significativa estadísticamente ($p > 0,05$) entre el número de CL y el número de embriones. El coeficiente de correlación de Pearson ($r = 0,146$) señala que hay en correlación débil al estar próximo a 0.

Tabla 10. Correlación entre el diámetro de CL y el número de embriones.

Diámetro de CL - Número de embriones	Estadístico de Pearson	- 0,497
	Valor p 0,05	0,174
	Datos	9*

*9 se refiere a los pares de datos estudiados y no al número de vaconas (10).

Fuente: Autora.

Existe una correlación negativa moderada ($r = - 0,497$) en cuanto al diámetro del CL con el número de embriones, que a mayor diámetro de CL será menor el número de embriones. No existe correlación significativa estadísticamente ($p > 0,05$).



Coeficiente de Tau-b de Kendall para relacionar número y tamaño de folículos preovulatorios y CL con la calidad de embriones obtenidos.

Tabla 11. Correlación entre número de folículos preovulatorios con la calidad de embriones.

Número de folículos preovulatorios - Calidad de embriones	Estadístico Tau-b de Kendall	0,272
	Valor p 0,05	0,110
	Datos	28*

* 28 se refiere a 28 pares de datos que son superiores al N de animales.

Fuente: Autora.

El coeficiente de correlación Tau-b de Kendall (0,272) indica que hay una relación baja entre el Número de folículos preovulatorios con la calidad de embriones, esta correlación no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$).



Tabla 12. Correlación entre el diámetro promedio de folículos preovulatorios con calidad de embriones.

Diámetro promedio de folículos preovulatorios - Calidad de embriones	Estadístico Tau-b de Kendall	0,400*
	Valor p 0,05	0,015
	Datos	28

*la correlación es significativa en el nivel de 0.05

N = 28 se refiere a 28 pares de datos estudiados que son superiores al N de animales.

Fuente: Autora.

Hay una correlación significativa ($p < 0,05$) entre diámetro promedio de folículos preovulatorios y calidad de embriones. La correlación de Tau-b de Kendall ($r = 0,400$) indica que hay una relación moderada y que mientras mayor sea el diámetro de los folículos preovulatorios mayor calidad tendrán los embriones obtenidos en un proceso de SOV.

Tabla 13. Relación entre número de cuerpos lúteos con calidad de embriones.

Número de CL - Calidad de embriones	Estadístico Tau-b de Kendall	-0,246
	Valor p 0,05	0,162
	Datos	28

N = 28 se refiere a 28 pares de datos estudiados que son superiores al N de animales.

Fuente: Autora.



El estadístico de Tau-b de Kendall ($r = -0,246$) indica que hay una correlación negativa débil al estar próximo a 0 y que a cuanto mayor número de CL menor será la calidad de los embriones. No hay correlación significativa estadísticamente ($p > 0,05$) entre las variables número de CL y la calidad de los embriones.

Tabla 14. Correlación entre diámetro de CL con calidad de embriones.

Diámetro de CL - Calidad de embriones	Estadístico Tau-b de Kendall	0,075
	Valor p 0,05	0,648
	Datos	28

N = 28 se refiere a los pares de datos estudiados que son superiores al N de animales.

Fuente: Autora.

No existe una correlación significativa ($p > 0,05$) entre el diámetro de CL con la calidad de embriones. El estadístico de Tau-b de Kendall ($r = 0,075$) indica que hay una correlación positiva muy baja al estar próximo a 0.



Tabla 15. Correlación entre número folículos preovulatorios y número de CL observados en un proceso de SOV.

Número de folículos preovulatorios - Número de CL	Estadístico de Pearson	0,853**
	Valor p 0,05	0,002
	Número de vaconas	10

**La correlación es significativa en el nivel de 0.01

Fuente: Autora.

En este estudio se encontró una correlación altamente significativa ($p < 0,01$) entre las variables número folículos preovulatorios y número de CL. El coeficiente de correlación de Pearson ($r = 0,853$) indica que hay una correlación positiva alta, y que a mayor número de folículos preovulatorios obtenidos en un proceso de superestimulación mayor será el número de cuerpo lúteos.



Discusión

Al realizar el análisis estadístico de las variables propuestas en esta investigación se obtuvo que la cantidad de folículos preovulatorios totales tuvo un promedio de $7,70 \pm 0,59$ con un diámetro de $9,5 \pm 0,19$ mm. Al comparar con los datos de Baruselli y col., (2006), quienes evaluaron el efecto de retrasar la ovulación en donantes Nelores (*Bos indicus*) utilizando un tratamiento con LH después de 12 a 24h de la última dosis de Folltropin-V, obtuvieron $12,5 \pm 1,5$; $9,4 \pm 1,0$ folículos mayores a 8 mm de diámetro al aplicar LH 12 h (día 8) y 24 h (día 8,5) después de la última dosis de Folltropin-V, se encuentra que los datos obtenidos son similares en cuanto al diámetro de los folículos, pero difiere en el número ya que se obtuvo una menor cantidad de folículos.

Ginther y col., (1996) mencionan que en vacas *Bos taurus* los folículos mayores a 10 mm de diámetro tienen capacidad ovulatoria, comparado con los resultados de la raza criolla son de menor diámetro, y están en un rango similar con la raza *Bos indicus* ya que los folículos con capacidad ovulatoria son de un diámetro mayor a 7,5 mm (Gimene y col., 2008); sin embargo, algunos trabajos en vacas y vaquillas reportan que el diámetro óptimo del folículo preovulatorio para incrementar la probabilidad de que una hembra quede preñada es de 13 a 15,2 mm y $\geq 12,8$ mm respectivamente, pero tiende a reducir cuando el diámetro es $< 12,8$ ó > 16 mm en vacas y $< 10,7$ ó $> 15,7$ en vaquillas (Perry y col., 2005; Lopes y col., 2007; Perry y col., 2007; Machado y col., 2012), los resultados son diferentes debido a que se encontró el 76,62% de folículos preovulatorios con diámetros entre 8 a 10 mm.



Aké y col., (1995), compararon la respuesta superovulatoria entre vacas *Bos indicus* y *Bos taurus* bajo condiciones de tropico, encontraron mejor respuesta en las donadoras *Bos indicus* que tuvieron mayor promedio de CL por vaca ($15,1 \pm 7,4$ vs $10,8 \pm 4,9$) respectivamente, y mayor promedio de embriones recuperados que las donadoras *Bos taurus* ($11,6 \pm 7,9$ vs $7,1 \pm 3,6$). Al comparar con el presente trabajo se obtuvo una media inferior de $6,80 \pm 0,46$ CL y menor cantidad de embriones colectados 3,11. Al contrastar con los datos obtenidos por Pallerano y col., (2003), quien superovuló búfalas utilizando un protocolo similar, los resultados fueron 5 folículos ≥ 8 mm en cuanto a la respuesta superovulatoria fue de 3 CL, por tanto los datos obtenidos en el presente estudio son superiores a los obtenidos por los autores, al igual que lo reportado por Kanuya y col., (1997) quienes obtuvieron una media de 2.8 embriones recolectados y 1.8 embriones transferibles utilizando FSH-p ; sin embargo al comparar con los valores reportados por (Ratto y col., (2008), quienes administraron 1500 UI de eCG en vacas suplementadas con Se, y obtuvieron una media de $5,6 \pm 3,6$ CL y $3,3 \pm 3,4$ estructuras los resultados son similares.

Las diferencias con los resultados mencionados anteriormente se deben posiblemente al tamaño de la muestra, el efecto del clima, la individualidad, el medio ambiente y la condicion corporal son la mayor fuente de variación en la respuesta superovulatoria; tambien se debe tener en cuenta lo mencionado por Baruselli y col., (2006), quien afirma que entre el 20 a 30% de las donadoras no responden al tratamiento superestimulador, otro 20 a 30% producen embriones de forma intermedia y finalmente un 20 a 30% responden bien a los protocolos de SOV.



El porcentaje de embriones obtenidos de acuerdo a la calidad de los embriones fue de 64,29% excelentes (CI), 7,14 % regular (CII) y de 28,57% muerto o degenerados (CIII). Estos resultados superan los de Kelly y col., (1997) quienes reportaron el 45.08% de sus embriones en grado I y II utilizando FSH-p, por otro lado son similares a los datos obtenidos por Aké y col., (1995); Mejía y Vásquez, (2002) quienes obtuvieron 64.7% de embriones grado I y II.

Kanuya y col., (1997) evaluaron la respuesta superovulatoria cuantitativa y cualitativas después del tratamiento con FSH en novillas y vacas de raza Jersey y Ayrshire respectivamente, obtuvieron un coeficiente de correlacion positivo ($r = 0,65$) y una significacion de $P < 0.05$ entre el número de CL y el número de embriones recuperados; tambien Aké y col., (1999) afirman que a mayor número CL mayor número de embriones, al contrastar con los resultados del presente trabajo difiere ya que se obtuvo una correlacion debil ($r = 0,146$) no significativa $p = 0,708$, hay que tener presente que el valor “ p ” alto puede ser debido al número de casos estudiados (10).

Kohrama y Poorhamdollaha (2012) superovularon vacas Holstein utilizando 400 mg FSH-p, observaron que los animales que tenian mayor número de folículos con un diámetro mayor a 7,6 mm al inicio del tratamiento de SOV dieron lugar a una mayor respuesta superovulatoria produciendo mas embriones de excelente calidad.

Estos resultados son similares, debido a que se determino una correlación ($r = 0,400$) significativa ($p = 0,015$) entre el diámetro del folículo preovulatorio con la calidad de embriones, con respecto a las correlaciones de número y diámetro de folículos



preovulatorios con número de embriones se obtuvo una relación muy debil pero no significativa ($p > 0,05$).



Conclusiones

- En este estudio se encontró $7,70 \pm 0,59$ folículos preovulatorios en promedio con un diámetro de $9,5 \pm 0,19$ mm en las vaconas criollas superovuladas.
- La media de CL observados fue $6,80 \pm 0,46$ con un diámetro de $15,6 \pm 0,24$ mm.
- El número promedio de embriones por vaquilla colectada fue de $3,11 \pm 0,80$, de los cuales el 64, 3% fueron calificados de excelente calidad.
- Se obtuvo relación baja no significativa entre las variables número, diámetro de folículos preovulatorios y CL con número de embriones y número, diámetro de CL con calidad de embriones, sin embargo existe una correlación moderada ($r = 0,400$) significativa ($p < 0,05$) entre el diámetro del folículo preovulatorio con la calidad de embriones, por lo tanto se dice que a mayor diámetro de folículo preovulatorio mayor calidad de embriones. Sin embargo, la poca información obtenida sobre producción de embriones en la raza criolla de la altura, impide que se emita un criterio de discusión sobre la hipótesis.
- Dentro de este estudio se observó una correlación positiva fuerte ($r = 0,853$) altamente significativa $p < 0.01$ entre el número de folículos preovulatorios con el número de CL, lo que nos indica que a mayor número de folículos preovulatorios mayor número de CL se obtendrá en un proceso de ovulación múltiple.

**Bibliografía:**

- Aguirre, L., Bermeo, A., Marza, D., & Merino, L. (2011). Estudio fenotípico y zoométrico del bovino criollo de la sierra media y alta de la región sur del Ecuador. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal (AICA)*, (págs. 392-396).
- Aké, J., Alfaro, M., & Lobos, H. (1995). Respuesta superovulatoria en gando *Bos indicus* y *Bos taurus* bajo condiciones tropicales, y efecto de desarrollo y calidad de embriones sobre el porcentaje de gestación. *Vet. Méx.*, 26(3), 189-193.
- Aké, J., Alfaro, M., Aguayo, A., & Lubos, H. (1999). Concentración plasmática de progesterona y producción embrionaria, en vacas superovuladas bajo condiciones tropicales. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 30(1), 19-23.
- Baruselli, P., de Sá, M., Martins, C., Nasser, L., Nogueira, M., Barros, C., & Bó, G. (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65(1), 77-88.
- Bó, G. A., Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R., & Mapletoft, R. J. (2009). Nuevos tratamientos hormonales para la superovulación de donantes de embriones bovinos. *8° Simposio Internacional de Reproducción Animal organizado por el IRAC. 10, 11 y 12 de Julio de 2009*, (págs. 1-12). Córdoba, Argentina.
- Bó, G. A., Cuaita, L., Souza, A., & Baruselli, P. (2008). Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche. *In Proceedings of the 3th International Symposium on Animal Reproduction Applied*, 95-110.
- Bó, G., Moreno, D., Cuaita, L., & Caccia, M. (2003). Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones. *Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva*. Bogotá.
- Brito, R. (1999). *Fisiología de la reproducción animal con elementos de biotecnología*. La Habana: Félix Varela.
- Cabodevila, J., & Torquati, S. (2001). Superovulación. En G. A. Palma, *Biotecnología de la reproducción* (1ra ed., págs. 79-108). Balcarce, Argentina: Ediciones INTA.



- Callejas, S. (2001). Fisiología del ciclo estral bovino. En G. A. Palma, *Biotecnología de la Reproducción* (1ra ed., págs. 37-52). Balcarce, Argentina: Ediciones INTA.
- Canabal, C. (2007). Descripción de los diferentes estados en vacas vacías. *Agrovetmarket*. Obtenido de Agrovetmarket.
- Caravaca, F., Castel, J., Guzmán, J., Delgado, M., Gerrero, N., Alcalde, J., & González, P. (2005). *Bases de la reproducción animal*. España: Universidad de Huelva.
- Castro, D. d., & Espinoza, D. J. (2009). Respuesta al tratamiento súper ovulatorio, con Folltropin-V (análogo sintético de la hormona foliculoestimulante-FSH), en hembras bovinas donantes, de las razas Pardo Suizo y Reyna, en fincas de la Universidad Nacional Agraria, Managua. (*Tesis de MVZ*) *Universidad Nacional Agraria*, (pág. 84). Managua, Nicaragua.
- Cevallos, O. F. (2012). Caracterización morfoestructural y fanerótipico del bovino criollo en la provincia de Manabí, Ecuador. Quevedo, Los Rios, Ecuador.
- Colazo, M., & Mapletoft, R. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*(9), 20-37.
- del Valle, T. (2008). Dinamica folicular ovárica durante el ciclo estral en vacas de doble proposito. En C. González, N. Madrid, & E. Soto (Edits.), *Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito* (págs. 1547-54). Venezuela: Astro Data S. A. Obtenido de Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito.
- Duica, A. (2010). Efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos. (*Tesis de maestria*) *Universidad de nacional de Colombia*, (pág. 190). Colombia.
- Durán, F. (2010). *Manual del ganadero actual*. Colombia: Grupo Latino Editor.
- Fernández, M. (2008). *Ciclo estral de la vaca diagnóstico fotográfico*. España: Servet.
- Fernandez, M. (2012). *Reproducción y control ecográfico en el vacuno*. Zaragoza, España: Servet.
- Forde, N., Beltman, M., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J., & Crowe, M. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 163-169.



- Fortune, J. (1933). Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? *Animal Reproduction Science*, 33(1-4), 111-125.
- Galina, C., & Valencia, J. (2009). *Reproducción de Animales Domésticos* (3ra ed.). México: Limusa.
- Garzón, N., Urrego, R., & Giraldo, C. A. (2007). Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2), 68-77. Recuperado el 13 de Febrero de 2014, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428098008>
- Gibbons, A., & Cueto, M. (2013). *Manual de transferencia de embriones ovinos y caprinos* (2da ed.). INTA.
- Gimene, L., Sá Filho, M., Carvalho, F., Torres-Júni, J., Souza, A., Madureira, E., . . . Baruselli, P. (2008). Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers. *Theriogenology*, 69(7), 852-8.
- Ginther, O. (2014). ¿Cómo las tecnologías de ultrasonido se han expandido y ha revolucionado la investigación en reproducción en animales grandes? *Elsevier*, 81, 112-125.
- Ginther, O., Wiltbank, M., Fricke, M., Gibbons, J., & Kot, K. (1996). Minireview Selection of the Dominant Follicle in Cattle. *Biology of Reproduction*, 55, 1187-1194.
- Gorlach, A. (1997). *Transferencia de Embriones en el ganado vacuno*. Zaragoza-España: Acribia S.A.
- Gorlach, A. (1999). *Transferencia de embriones en el ganado vacuno*. Zaragoza, España.: Acribia.
- Hafez, E. (1996). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (3 ed.). Interamericana.
- Illera, M. (1994). *Reproducción de animales domésticos*. Barcelona: Aedos. S.A.
- Jiménez, C. (2009). Superovulación : estrategias , factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Rev. Med. Vet. Zoot*, 56, 195-214.
- Kanuya, N., Callesen, H., Hyttel, P., Assey, R., & Greve, T. (1997). Superovulatory response of dairy (Bos taurus) in a tropical environment. *Theriogenology*, 47, 1583-1593.
- Norma Alejandrina Gordillo Lema.



- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J., & Boland, M. (1997). Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science.*, 46, 1 - 14.
- Kohrama, H., & Poorhamdollaha, M. (2012). Relationships between the ovarian status and superovulatory responses in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 131, 123– 128.
- Lazaridis, L., Brozos, C., & Kiossis, E. (2012). Las aplicaciones de la ecografía en rumiantes: Sistema reproductivo femenino. *Hellenic Veterinary Medical Society*, 63, 74-88.
- Lopes, A., Butler, S., Gilbert, R., & Butler, W. (2007). Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal reproduction science*, 99(1-2), 34-43. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.04.056
- Lucy, M. (2007). The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci*, 85, 89-99.
- Machado, L., Bonilla, S., Schneider, A., Schmitt, E., & Correa, m. (2012). Revista Brasileira de Zootecnia Effect of the ovulatory follicle diameter and Progesterone concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(4), 1004-1008.
- Maldonado, J. G., & Bolívar, P. A. (2008). Racionalidad en los esquemas de SOV y sincronización en la Transferencia de Embriones en bovinos: ¿terapéutica basada en la evidencia o ausencia de ética? *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(3), 436-550. Recuperado el 13 de marzo de 2014, de <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/viewFile/363/361>
- Mapletoft, R. J., Steward, k. B., & Adams, G. P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42(6), 601-11.
- Mapletoft, R., Tribulo, A., & Bó, G. A. (2011). Evaluación de los protocolos de superovulación en bovinos. *Memorias IX Simposio Internacional de Reproducción Animal – IRAC*, (pág. sn). Córdoba-Argentina. Recuperado el 01 de enero de 2015, de http://www.chalver.com/docs/veterinaria/Evolucion_de_los_Protocolos_de_Superovulacion_en_bovinos.pdf



- Matteri, R., & Moberg, G. (1982). Effect of cortisol or adrenocorticotrophin on release of luteinizing hormone induced by luteinizing hormone releasing hormone in the dairy heifer. *J Endocrinol*, 92(1), 141-6.
- Meda, P. (2012). Población Folicular y Época en la eficiencia de un programa de Transferencia de Embriones Divididos en Vaquillas Holstein. (*Tesis de Maestría*) Universidad Autónoma Chapingo, (pág. 56). Chapingo-México.
- Mejía, R., & Vásquez, C. (2002). Evaluación de la técnica de transferencia de embriones bajo las condiciones de Zamorano. (*Tesis Ing. Agr.*) Escuela Agrícola Panamericana, (págs. 9-14). Zamorano, Honduras.
- Motta, P., Cuéllar, N., Sánchez, C., & Castro, E. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Vet. Zootec*, 5(2), 88-99.
- Motta, P., Ramirez, N., Ramos, N., Valencia, A., & Perdomo, w. (2011). Respuesta superovulatoria en número y calidad embrionaria de vacas y novillas Gyr lechero en clima cálido húmedo. *RETVET*, 12(10), 14.
- Neira, J. (2011). Determinación de preñez y mortalidad embrionaria tardía y fetal temprana mediante ultrasonografía en vaquillas de leche sincronizadas con prostaglandina. (*Tesis de pregrado*) Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile.
- Orellana, J., & Peralta, M. (2007). Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies. (*Tesis de pregrado*). Universidad Zamorano, Honduras.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación(FAO); Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente(PNUMA). (1981). *Recursos genéticos animales en américa latina ganado criollo y especies de altura*. Roma.
- Paez, E. (2012). Módulo de reproducción animal avanzada. UNAD. Colombia.
- Pallerano, G., Maldonado, P., Rodríguez, S., Arzeno, M., & Crudeli, G. (2003). Evaluación de diferentes Protocolos de Superovulación en Búfalos en el NEA Argentino. *Universidad Nacional del Nordeste comunicaciones científicas y tecnológicas*, (pág. sp). Argentina.



- Palma, G. (1993). Evaluación morfológica de los embriones. En G. Palma, & G. Brem, *Transferencia de Embriones y Biotecnología de la reproducción bovina* (pág. 503). Hemisferio Sur.
- Palma, G. (2001). *Biotecnología de la reproducción*. Argentina: Hemisferio sur.
- Perry, G., Smith, M., Lucy, M., Green, J., Parks, T., MacNeil, M., . . . Geary, T. (2005). Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *PNAS*, 102(14), 5268 –5273.
- Perry, G., Smith, M., Roberts, A., MacNeil, M., & Geary, T. (2007). Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J ANIM SCI*, 85(3), 684-689.
- Quintanella, L., Días de Pablo, C., García, P., Peña, A., & Becerra, J. (2006). *Ecografía y reproducción de la vaca*. Santiago de Compostela: Imprenta universitaria sur.
- Ratto, M., Ceballos, A., Matamoros, R., & Wittwer, F. (2008). Suplementación con selenio, respuesta superovulatoria y recuperación de embriones en bovinos lecheros tratados con eCG. *Vet.zootec.*, 2(2), 53-58.
- Reppi, C. (2009). El ciclo estral. *Dairy Cattle Reproduction Conference*, 111-16.
- Rivadeneira, V. (2013). Ciclo estral bovino. *Sirivs*, 12.
- Rosario. (1983). *Endocrinología veterinaria y reproducción* (1ra ed., Vol. 4). México: Interamericana.
- Sartori, A., & Barros, C. (2011). Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 244-50.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Estado de Chiapas. (2006). Manual de transferencia de embriones en el ganado bovino. Estado de Chiapas. Recuperado el 7 de Marzo de 2014
- Stingfellow, D., & Siedel, S. (2000). *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (I.E.T.S.)*. Illinois U.S.A.
- Suárez, D., Gaviria, M., & Gómez, C. (6 de Marzo de 2001). La buserelina en programas de superovulación para transferencia de embriones. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*, 14(2), 127-133.



- Tamayo, M. (2005). La ecografía como medio diagnóstico y evaluación de los procesos reproductivos en los bovinos. *Prof. de Reproducción y Biotecnología de la Reproducción. Departamento de Clínica, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de La Habana*. San José, La Habana.
- Tovío, N. (2008). Desarrollo embrionario estrategias antiluteolíticas hormonales en programas de transferencia de embriones bovinos. *Rev. MVZ Córdoba*, 13(1), 1240-1251.
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Mapletoft, R., & Bó, G. (20012). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, 77(8), 1679-85.
- Trujillo, R. (s.f.). *Manual de Biología y Reproducción de los Animales Domesticos*. Ecuador: Freire.
- Urrego, R. (2006). Implicaciones de la biotecnología reproductiva en la producción animal. *recalyc. argo*, 2(2).
- Velazquez, M. (2008). Assisted reproductive technologies in cattle: applications in livestock production, biomedical research and conservation biology. , 10,. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 10, 36-62.
- Vélez, M., Hincapié, J., & Matamoros, I. (2009). Producción de ganado lechero en el trópico. *Zamorano Academic Press*. Zamorano, Honduras.
- Vidal, V. C. (2009). Caracterización del comportamiento productivo y reproductivo del ganado criollo pizán. Riobamba, Chimborazo, Ecuador.
- Vieira, V. L. (2009). Efeito do pré-tratamento com somatotropina recombinante bovina (rbST) sobre a resposta superovulatoria e viabilidade de embriões de doadoras nelore. *Universidade Federal da Bahia*, 89.

**Anexos****Anexo 1. Prueba de normalidad para las variables en estudio.**

Variables	Shapiro-Wilk ^a		
	Estadístico	gl	Valor p*
Nº de folículos preovulatorios	0,964	10	,835
Diámetro promedio de folículos preovulatorios	,915	10	,319
Nº de CL	,897	10	,202
Diámetro promedio de CL	,971	10	,897
Nº de embriones	,811	10	,027

**Anexo 2. Protocolo de Superovulación de las vaquillas****PROTOCOLO DE SUPEROVULACIÓN****Vaconas criollas.****Protocolo:**

Fecha	Día	Hora	Tratamientos
11/08/2014	0	09am	Se colocó implante CIDR®, (1,9g) +Benzoato de estradiol 2mg (2ml) + P ₄ 50mg (1 ml)
15/08/2014	4	6am	FSH (FOLLTROPIN-V) 2.5cc (50mg)
		6pm	FSH (FOLLTROPIN-V) 2.5cc (50mg)
16/08/2014	5	6am	FSH (FOLLTROPIN-V) 2cc (40mg)
		6pm	FSH (FOLLTROPIN-V) 2cc (40mg)
17/08/2014	6	6am	FSH (FOLLTROPIN-V) 1.5cc (30mg) +PGF2 α 2cc (Lutalise®) Retirar implante
		6pm	FSH (FOLLTROPIN-V) 1.5cc (30mg) +P PGF2 α 2cc (Lutalise®)
18/08/2014	7	6am	FSH (FOLLTROPIN-V) 1cc (20mg)
		6pm	FSH (FOLLTROPIN-V) 1cc (20mg)
19/08/2014	8		Detección de celos e inseminación y medición de folículos preovulatorio a las 10 horas en la primera inseminación + GnRH 0,5 mg (Fertagyl®)
20/08/2014	9		medición de folículos a las 10 horas de la segunda inseminación
26/08/2014	15		Conteo y Medición de cuerpos lúteos Colecta y evaluación de embriones.

**4. Ecografía Previa Colecta**

OVARIOS	DERECHO	IZQUIERDO
# Folículos		
# Cuerpos Lúteos		

5. Colecta de Embriones:

a) Fecha: _____ b) Hora: _____

c) # Total de Embriones Colectados: _____

6. Evaluación Morfológica:

a) Códigos para Evaluación

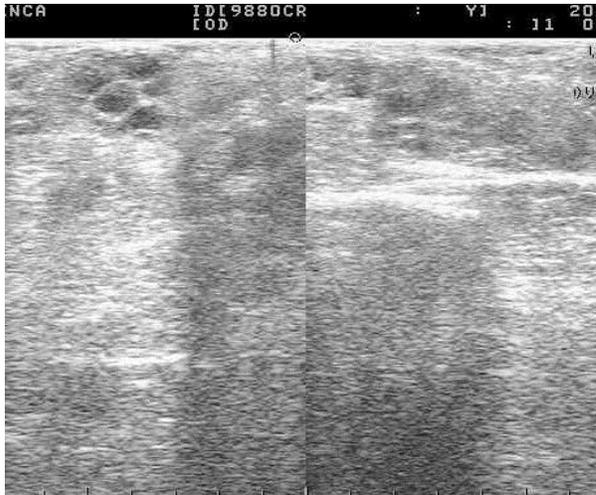
# Embrión	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Estado																									
Calidad																									

Estado de Desarrollo	
N°	Estado
1	No fecundado
2	2-a 12-celulas
3	Mórula Temprana
4	Mórula
5	Blastocisto Temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto Expandido
8	Blastocisto Eclosionado
9	Blastocisto Eclosionado Expandido

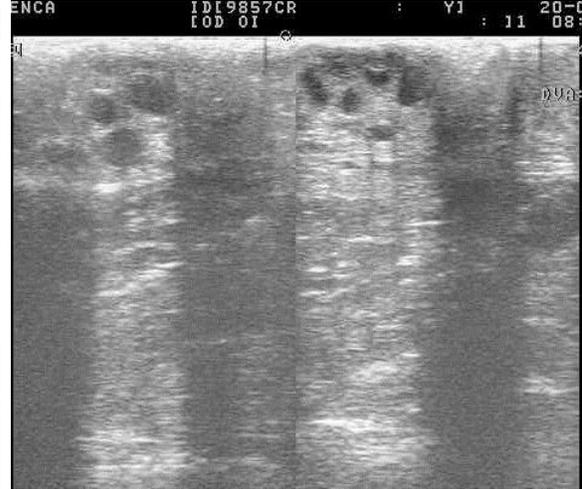
Calidad de Embriones	
Código 1	Excelente o Bueno
Código 2	Regular
Código 3	Malo
Código 4	Muerto/Degenerado

 NORMA GORDILLO

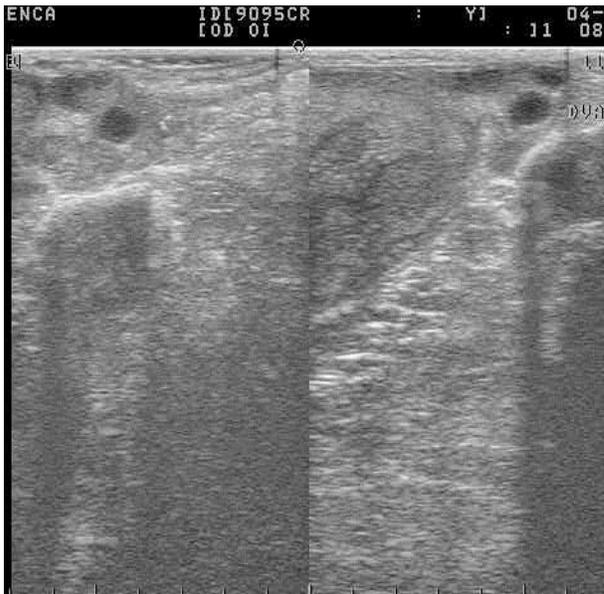
Anexo 6. Ecografías de folículos preovulatorios



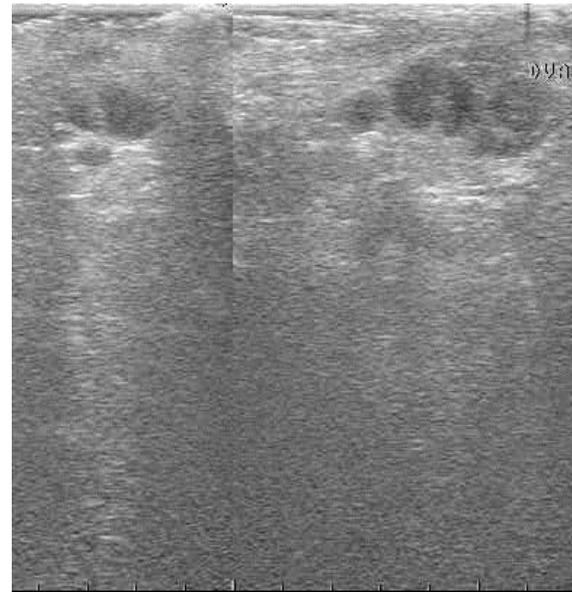
Ecografía de OI de vacona 9880



Ecografía de OD y OI de vacona 9857

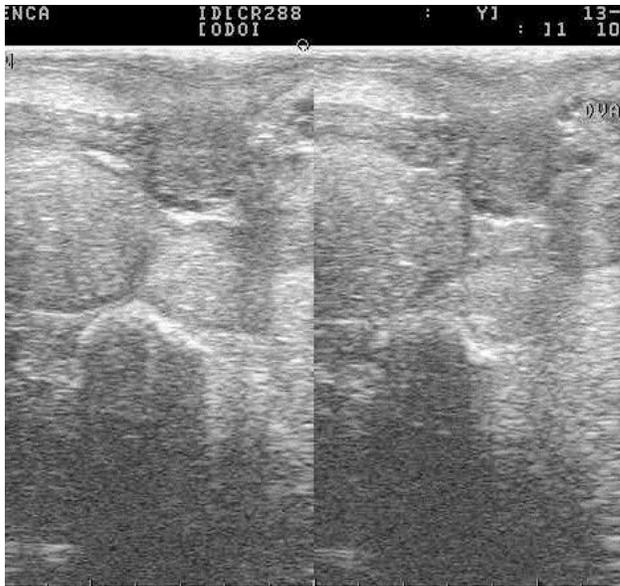


Ecografía de OD y OI de vacona 9095

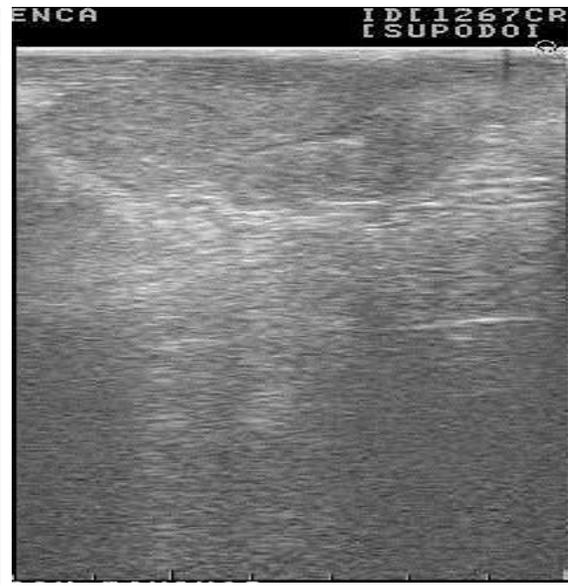


Ecografía de OD y OI de vacona 424

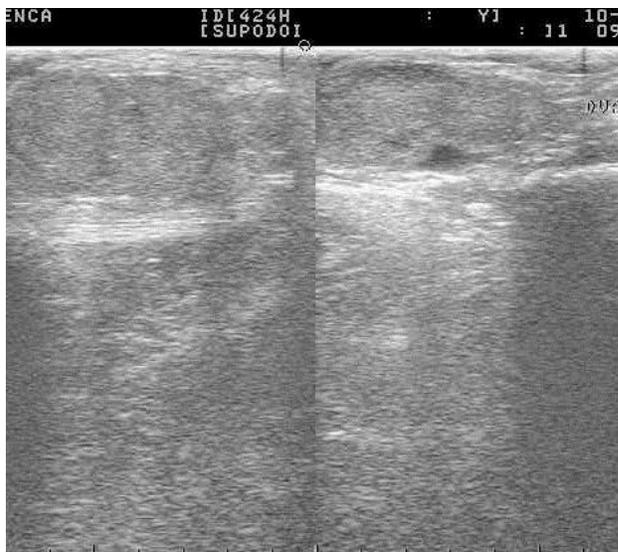
Anexo 7. Ecografías de CL



Ecografía de OD y OI de vacona 288



Ecografía de OD y OI de vacona 9857



Ecografía de OD y OI de vacona 424



Ecografía de **OD** de vacona 9880

Anexo 8. Fotografía de embriones recolectados

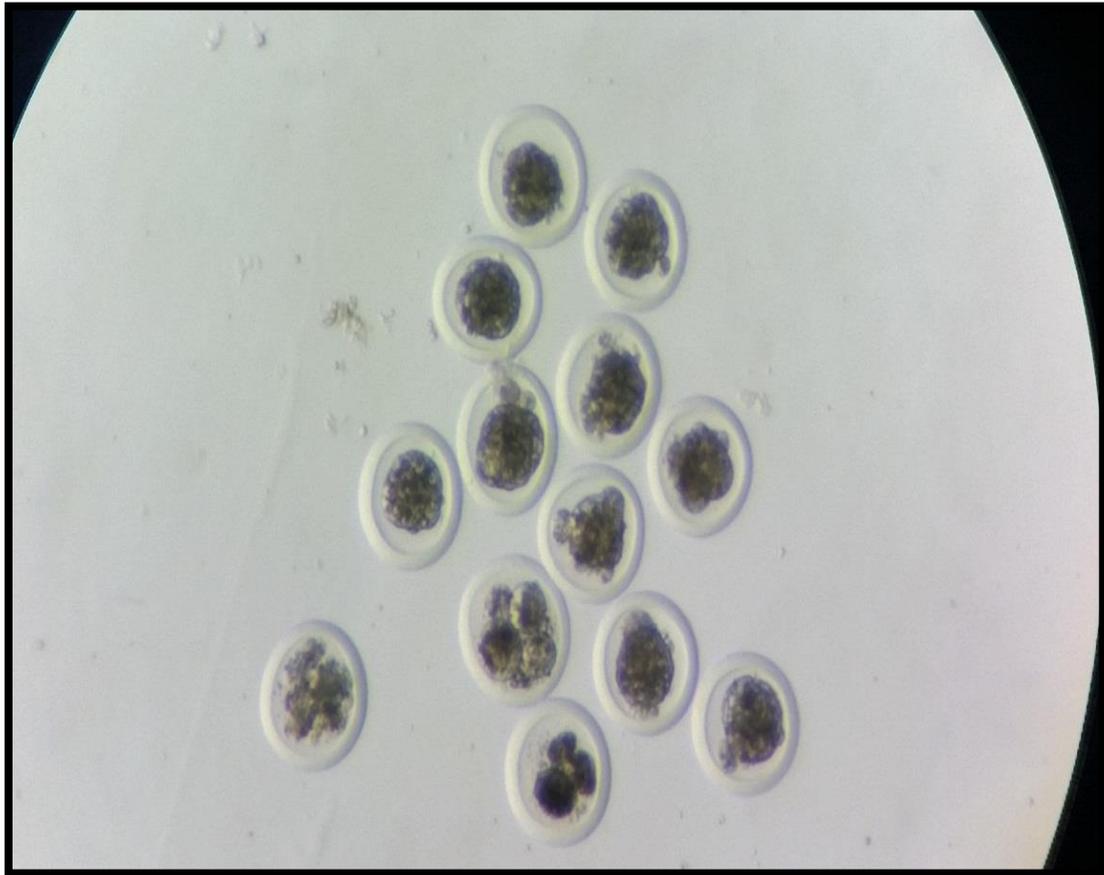


Foto No. 1: Se observa número y estadíos de embriones



Anexo 9. Adaptación de animales



Fotografía 2. Fase de adaptación de las vaconas criollas.

Anexo 10. Fotos trabajo de campo



Foto 3. Entrada de para el monitoreo.



Foto 4. Materiales para sincronización.



Foto 5. Colocación del dispositivo en el aplicador.



Foto 6. Aplicación de FSH.



Foto 7. FSH (Folltropin-V).



Foto 8. Monitoreo.

Continuación del anexo 10



Foto 9. Aplicación de parche detector de celo.



Foto 10. Lavado de embriones



Foto 11. Búsqueda de embriones.



Foto 12. clasificación de embriones.