



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

TITULO:

“RELACIÓN ENTRE DURACIÓN Y DIFICULTAD DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CON LA TASA DE PREÑEZ EN VACONAS Y LA CAPACIDAD DEL FLUNIXIN MEGLUMINE (FM) APLICADO IV O IM PARA MODIFICARLA”

*Tesis previa a la obtención del título de
Magister en Reproducción Animal*

AUTOR: Juana Catalina Durán López MVZ. CI. 010404618-0

DIRECTOR: Carlos A. Soria Parra Dr. MsC. CI. 1800857342

CUENCA, ECUADOR

2017

**RESUMEN**

En la Superovulación y transferencia de embriones (SOTE) existen dos puntos clave: la recuperación de los embriones en la donante y la gestación de los mismos en la receptora. La transferencia propiamente dicha presenta dificultades que son causa de pérdida de gestaciones. Tanto la duración de la maniobra (medida objetiva) como la dificultad manifestada por el operador (medida subjetiva) han sido mencionadas por diversos autores pero pocas veces estudiadas en conjunto y relacionadas con la preñez. Es conocido que tales dificultades provocan liberación de PGF2 α y ésta produce efectos negativos tanto en el embrión como en el cuerpo lúteo. Desde los primeros minutos después de iniciada la maniobra se observan niveles elevados de esta hormona en sangre. Se ha intentado el uso de antiprostaglandínicos como Flunixin Meglumine (FM), aplicados al momento de la transferencia de embriones (TE) con resultados variados. La inyección utilizada por todos los autores fue intramuscular y no siempre se relacionó con la dificultad de la transferencia y ambos hechos podrían explicar la divergencia de la información. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) determinar la relación entre las dificultades observadas en la transferencia de embriones y la tasa de preñez y 2) evaluar si el FM aplicado por vía intramuscular (IM) o intravenoso (IV) pueden modificar esta relación. Se utilizaron 110 receptoras, se midió la duración de la transferencia y la dificultad manifestada por el operador. Estas receptoras fueron divididas en tres grupos: control (sin tratamiento); 2,2 mg/kg de FM IM y 2,2 mg/kg de FM IV. Se determinó el porcentaje de preñez entre los 30-40 días posteriores a la TE y se realizó una reconfirmación a los 60-90 días posteriores a la TE. La aplicación del FM IV post TE mostró una tasa de preñez a los 30-40 días significativamente superior (75%, $p < 0,001$) en comparación al grupo control (45%) y al grupo IM (33,3%). Con lo que se concluye que la aplicación IV de FM es efectiva para mejorar el porcentaje de preñez en receptoras de embriones cuando la transferencia dura menos de 45,5 segundos.

PALABRAS CLAVES: RECEPTORAS, TRANSFERENCIA DE EMBRIONES, FLUNIXIN MEGLUMINE, PROSTAGLANDINA.



ABSTRACT

Two key points exist in superovulation and embryo transfer (SOET): the recovery of the embryos in the donor and the gestation of the embryos in the recipient.

Embryo transfer at such, presents some difficulties that are the cause of gestation loss. Both, the maneuver duration (objective measurement) and the difficulty manifested by the operator (subjective measure) have been mentioned by several authors but rarely studied together and connected to pregnancy. It is known that such difficulties cause PGF2 α release and this produces negative effects on both, the embryo and the corpus luteum. From the first minutes after the start of the maneuver, elevated levels of this hormone in the blood are observed. The use of Flunixin Meglumine (FM) antiprostaglandins applied at the time of embryo transfer (ET) has been attempted with varying results. The intramuscular injection used by all authors was not always connected to the difficulty of the transfer and both facts may explain the divergence of the information. The aims of this study were: 1) to determine the relationship between the difficulties observed in embryo transfer and the pregnancy rate; and 2) to evaluate whether intramuscular (IM) or intravenous (IV) can modify this relationship. 110 recipients were used, the duration of the transfer and the difficulty manifested by the operator were measured. These recipients were divided in three groups: control (no treatment); 2,2 mg / kg FM IM and 2,2 mg / kg FM IV. The pregnancy rate was determined between 30-40 days post ET and a reconfirmation was performed at 60-90 days post ET.

The application of FM IV post TE showed a gestation rate significantly higher at 30-40 days (75%, $p < 0,001$) compared to the control group (45%) and IM group (33,3%). It is concluded that the FM IV application is effective in improving the gestation rate in embryo recipients when the transfer lasts less than 45,5 seconds.

KEYWORDS: RECIPIENTS, EMBRYO TRANSFER, FLUNIXIN MEGLUMINE, PROSTAGLANDIN.



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
DERECHOS DE AUTOR	9
CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	10
AGRADECIMIENTOS	11
DEDICATORIA.....	13
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	14
CAPITULO II: OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL	17
HIPOTESIS	17
CAPITULO III: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. GENERALIDADES	18
3.2. SUPEROVULACIÓN	19
3.3. COLECTA DE EMBRIONES	20
3.5. RECEPTORAS	25
3.5.1. SELECCIÓN DE RECEPTORAS	25
3.5.2. SINCRONIZACIÓN DE CELO EN RECEPTORAS	26
3.6. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	29
3.7. PROSTAGLANDINAS	31
3.7.1. PROSTAGLANDINA F2α	31
3.7.2. EFECTO DE LA PROSTAGLANDINA EN LA IMPLANTACIÓN DEL EMBRIÓN	33
3.8. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES):	34
3.8.1. FLUNIXIN MEGLUMINE (FM)	35
3.8.2. EFECTO DEL FLUNIXIN MEGLUMINE SOBRE LOS EMBRIONES	37
CAPITULO IV: METODOLOGÍA	39
4.1. ANIMALES	39



4.2. EMBRIONES.....	39
4.3. DETERMINACIONES REALIZADAS	40
4.4. TRATAMIENTOS	40
4.5. METODOLOGÍA DE LA TRANSFERENCIA PROPIAMENTE DICHA	41
4.5.1. Preparación de la Receptora y Transferencia del embrión.....	41
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
CAPITULO V: RESULTADOS.....	43
5.1. Relación entre las dos formas evaluadas para categorizar la dificultad de la TE	43
5.2. Relación entre el grado de dificultad de la TE y la tasa de preñez a los 30-40 y 60-90 días después de la TE.....	44
5.3. Efecto del tratamiento con flunixin meglumine al momento de la TE sobre la tasa de preñez a los 30-40 y 60-90 días después de la TE	46
5.4. Efecto del tratamiento con flunixin meglumine al momento de la TE según la duración y la dificultad subjetiva de la transferencia de embriones sobre la tasa de preñez a los 30-40 y 60-90 días después de la TE.....	47
CAPITULO VI: DISCUSIÓN	49
CAPITULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
7.1. CONCLUSIONES:	55
7.2. RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA:	57
ANEXOS	65



LISTADO DE GRÁFICOS

Gráfico 1.- Posición del balón para realizar el lavado de embriones en vacas donantes. (Elsden et al., 1976).....20

Gráfico 2.- Lavado de embriones de vacas donadoras. (Elsden et al., 1976).....20

Gráfico 3.- Estadíos de desarrollo de los embriones (Stringfellow & Seidel, 2000).....22

Gráfico 4.- Efecto de calidad embrionaria sobre el porcentaje de preñez (Cutini et al., 2000).....23

Gráfico 5.- Efecto de la condición corporal en receptoras de embriones bovinos sobre el porcentaje de preñez (Cutini et al., 2000).....24

Gráfico 6.- Porcentaje de preñez en receptoras tratadas con un implante de P4 que fueron transferidas a tiempo fijo y de receptoras tratadas con PGF2 α y transferidas a los 7 días luego de que se ha observado el celo (Bó et al., 2004).....25

Gráfico 7.- Efecto del momento de aplicación de la PGF sobre el porcentaje de preñez en vacas receptoras de embriones y porcentaje de preñez en vacas tratadas con dispositivos intravaginales de P4 y estrógenos (Bó et al., 2004).....26

Gráfico 8.- Representación sistemática de la síntesis de la PrsotglandinaF2 α .
PGF2 α = Prsotglandina F2 α ; OT= Oxitocina; E2= Estradiol; P4= Progesterona; E2-R= Receptor para estradiol; OT-R= Receptor para Oxitocina (Aké-López, 2002).....31

Gráfico 9.- Representación de la cascada que conduce a la producción de las prostaglandinas; se indica el sitio de acción del flunixin meglumine para inhibir la síntesis de las mismas. (Aké-López, 2002).....34



LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1** .-Media del número de CL y el porcentaje de preñez (%) en receptoras tratadas con un dispositivo de P4 intravaginal simultáneamente con 2 mg de BE intramuscular con o sin 50 mg de progesterona por vía intramuscular el día cero, 400UI de eCG y 0,15 mg de D-cloprostenol por vía intramuscular colocado el día 5 u 8 del tratamiento (Nasser et al., 2004).....27
- Tabla 2**.- Correlación entre tiempo y dificultad de la transferencia de embriones en vaconas (Spearman).....41
- Tabla 3**.- Correlación entre tiempo y dificultad de la transferencia de embriones en vaconas (Pearson).....42
- Tabla 4**.- Tasa de preñez y pérdidas embrionarias según el tiempo empleado en la transferencia de embriones.....43
- Tabla 5**.- Tasa de preñez y pérdidas embrionarias según la dificultad manifestada por el operador en la transferencia de embriones.....43
- Tabla 6**.- Tasas de preñez en vaconas receptoras de embriones tratadas con FM por diferentes vías de administración al momento de la TE.....44
- Tabla 7**.-Tasas de preñez en vacas transferidas y tratadas con FM por diferentes vías en función de la duración de la manipulación.....45
- Tabla 8**.- Tasas de preñez en vaconas receptoras de embriones y tratadas con FM por diferentes vías de administración de acuerdo con la dificultad subjetiva de la



manipulación.....46

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1.- Chi cuadrado para la tasa preñez a los 30 – 40 días y el grado de dificultad....63

Anexo 2.- Chi cuadrado para la tasa preñez a los 60 – 90 días y el grado de dificultad...
.....64

Anexo 3.- Correlaciones de Pearson para los grupos Control, FM-IV y FM-IM.....65

Anexo 4.- Correlaciones de Spearman para los grupos Control, FM-IV y FM-IM.....67

Anexo 5.- Chi cuadrado para la tasa preñez a los 30 – 40 días y grupos de tratamiento
.....69

Anexo 6.- Chi cuadrado para la tasa preñez a los 60 – 90 días y grupos de tratamiento
.....71

Anexo 7.- Detalle de las transferencias realizadas y el diagnostico de preñez en el Grupo FM-IV.....73

Anexo 8.- Detalle de las transferencias realizadas y el diagnostico de preñez en el Grupo FM-IM.....74

Anexo 9.- Detalle de las transferencias realizadas y el diagnostico de preñez en el Grupo Control.....75

Anexo 10.- Fotografías.....76



DERECHOS DE AUTOR

Yo, **JUANA CATALINA DURÁN LÓPEZ** autora de la tesis **“RELACIÓN ENTRE DURACIÓN Y DIFICULTAD DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CON LA TASA DE PREÑEZ EN VACONAS Y LA CAPACIDAD DEL FLUNIXIN MEGLUMINE (FM) APLICADO IV O IM PARA MODIFICARLA”**, 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 **MAGISTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implica afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 10 de marzo, 2017.



Juana Catalina Durán López MVZ.

CI. 010404618-0

CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, **JUANA CATALINA DURÁN LÓPEZ** autora de la tesis “**RELACIÓN ENTRE DURACIÓN Y DIFICULTAD DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CON LA TASA DE PREÑEZ EN VACONAS Y LA CAPACIDAD DEL FLUNIXIN MEGLUMINE (FM) APLICADO IV O IM PARA MODIFICARLA**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 10 de marzo, 2017.



Juana Catalina Durán López MVZ.

CI. 010404618-0

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer infinitamente a mis papis Paco y Colomba por su amor y el apoyo incondicional durante toda mi vida; por el estímulo y la guía que me han brindado para lograr cumplir cada una de mis metas.

A mis hermanas Ma. Elisa y Elena por ser mi apoyo y soporte en cada una de las etapas de mi vida.

A mi abuelita Mimí; a mis tías y mis primas por ser un pilar fundamental en mi vida.

Al Dr. Carlos Soria Parra, amigo y director de esta tesis hago extensivo mi agradecimiento por el apoyo brindado y la oportunidad de permitirme desarrollar este trabajo.

Al Dr. Ricardo Alberio por su paciencia y su disponibilidad durante todo el desarrollo de mi trabajo.

Al MVZ MsC Daniel Argudo Garzón por su apoyo absoluto durante el desarrollo de esta tesis.



Al Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca, de manera especial al Ing. Javier Serrano Salgado y a la Dra. Emma Mora Andrade por su apoyo brindado para lograr cumplir esta meta profesional.

Al Dr. Guillermo Guevara y al Economista Carlos Torres por la ayuda brindada.

Juana C.



DEDICATORIA

A mis papis, Paco y Colomba por haber sido un ejemplo de dedicación y entrega; gracias a su incondicional amor y apoyo me inspiran a ser mejor cada día y lograr superarme.

Juana C.



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) es una biotécnica reproductiva que se utiliza en la mayoría de los países del mundo y, principalmente, en aquellos de alto desarrollo de la ganadería, donde ha tenido un progreso vertiginoso en los últimos veinte años. Esta técnica, al igual que en los machos lo hace la inseminación artificial, permite un mayor aprovechamiento de los animales de genética superior pues ayuda a su multiplicación. Al mismo tiempo permite reducir el intervalo generacional al posibilitar la producción de numerosa descendencia a partir de animales jóvenes, posibilita el comercio internacional de germoplasma, ayuda al control de enfermedades y a reproducir algunos animales con problemas de fertilidad.

Su origen se remonta a los trabajos efectuados por Walter Heape a finales del siglo XIX que demostró, en conejos, que las características fenotípicas de un embrión no eran afectadas por las condiciones del útero de la progenitora (Heape, 1890).

Referido al ganado vacuno en particular, Martínez (2006), en su Tesis doctoral expresa que: **“Luego de la Segunda Guerra Mundial, los científicos de la agricultura comenzaron a pensar seriamente en el uso de la transferencia embrionaria para programas de mejoramiento en bovinos”**. Sin embargo, no fue hasta el año 1951 en que se llevó a cabo la primera transferencia de embriones en esta especie con buenos resultados y, posteriormente, en la década de los años 70 comenzó de forma intensificada su utilización comercial.

Por su parte, en el año 1985 fue aplicada en Ecuador la transferencia de embriones frescos en bovinos y como consecuencia de ello nacieron las primeras crías producto del uso de esta técnica y, dos años después, nacieron dos terneros como resultado de la aplicación de la TE congelados (Gorfrey, 1991; citado por Salinas, 2013)

Una vez determinada la posibilidad de hacer desarrollar un embrión en un útero ajeno al individuo que lo produjo (donante), surgió el interés de hacer producir más embriones al individuo donante de manera de poder así multiplicar su progenie. De esta manera surgió la práctica de provocar la superovulación en las hembras denominadas donantes para conseguir de ellas la mayor cantidad de óvulos fecundados los cuales serán extraídos para transferirse a las llamadas hembras receptoras. La superovulación hoy es una técnica generalizada que, sin embargo, aún presenta una gran variabilidad, particularmente en la respuesta de la vaca donante.

Por otro lado, los índices de preñez después de la transferencia, pueden estar influenciados tanto por el tipo de embrión (calidad y/o edad) transferido como por las



maniobras que se ejecutan para ello. Estas últimas tienen una gran importancia en los resultados finales del proceso y dependen sobre todo del operador aunque también de las dificultades anatómicas que presente la hembra receptora que por su lado también van a afectar al operador. De acuerdo con esto, es de interés poder cuantificar precisamente el peso de estas variables ya que conociéndolo, será posible implementar acciones para su mejora.

Una de las situaciones que es posible evaluar en forma **objetiva**, es el tiempo en que se ejecuta la maniobra. En general se ha descrito que a mayor tiempo en la misma, se disminuyen las probabilidades de que se establezca una preñez (Tervit, Cooper, Goold, & Haszard, 1980). Asimismo, las dificultades que el operador tiene para concretar la maniobra (**observación subjetiva**), también van a afectar la sobrevivencia del embrión transferido (Gordon, 1976).

La existencia de estos aspectos es destacada por varios autores pero pocas veces han sido estudiados en su relación con la supervivencia embrionaria.

Algunos de los estudios efectuados sobre la transferencia de embriones propiamente dicha, indican que **“las manipulaciones del útero generan liberación de Prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) por parte del endometrio** (Velez, Randel, & Neuendorff, 1991; Wann & Randel, 1990). Por su lado, Scenna et al. (2005) determinaron que **“la manipulación transrectal incrementa los niveles de esta hormona”** provocando **“efectos negativos al disminuir la vida del cuerpo lúteo y afectando así el mantenimiento del embrión en el útero”** (Garrote & Scardaccione, 2010). Como consecuencia de estos conceptos es posible inferir que en la medida que aumentan el tiempo y/o las dificultades en la transferencia propiamente dicha, se afectará la tasa de sobrevivencia (y por lo tanto de gestación) de los embriones transferidos.

De acuerdo con lo anterior surge el interés de realizar la determinación de una medida confiable de la calidad de la transferencia de embriones; ya sea por su evaluación subjetiva u objetiva; y por ello es de interés establecer la correlación entre ambos tipos de valoración (tiempo y dificultad) y a su vez la relación con la eficiencia de la transferencia de embriones medida por la tasa de preñez.

Para contrarrestar los efectos negativos de la PGF2 α (tal como mencionaron algunos de los autores citados) en este momento del ciclo (primeros días después de la transferencia, días 7 a 9 postovulación), se ha intentado reducir sus niveles a través de la inhibición de enzimas que participan en su síntesis. Para ello se ha utilizado, con resultados disímiles, el flunixin meglumine (FM; inhibidor de la ciclooxigenasa que es la responsable de la síntesis de PGF2 α a partir del ácido araquidónico) por vía intramuscular en el momento en que se efectúa la transferencia embrionaria (Purcell,



Beal, & Gray, 2005; F. Schrick et al., 2001). Estos y otros resultados obtenidos, mostraron inconsistencias en cuanto a la tasa de preñez obtenida después de la transferencia de embriones acompañada o no con FM. Sin embargo, los investigadores no consideraron que tal vez, la inconsistencia de las respuestas de su uso podría estar dada por la ocurrencia o no de dificultades en la TE, o simplemente por la vía de administración de la droga que se estaba utilizando. De acuerdo al trabajo de Scenna et al. (2005), la liberación de PGF2 α después de una manipulación del útero es muy rápida con lo cual la aplicación por vía venosa podría ser más eficiente para aminorar el efecto luteolítico y embriotóxico de esta hormona (Scenna et al., 2004).

Lo hasta aquí referido lleva al planteamiento del siguiente problema:

No se conoce con precisión la relación existente entre las dificultades que surgen durante la transferencia de embriones, con la eficiencia de la gestación en las receptoras, ni las causas de la baja efectividad del Flunixin Meglumine, aplicado por vía intramuscular, para contrarrestar la acción de la PGF2 α .

A partir de esta problemática, surgen las siguientes preguntas científicas:

- ¿La medida subjetiva de dificultad en la TE está correlacionada con su determinación objetiva según el tiempo que lleva hacerlo?
- ¿La dificultad en la TE, tiene relación con la tasa de preñez obtenida?
- ¿La aplicación de la Flunixin Meglumine por vía intravenosa puede modificar la tasa de preñez después de la TE?



CAPITULO II: OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Mejorar la tasa de preñez después de la transferencia de embriones a través de la disminución del efecto de la dificultad de la maniobra o de disminuir el impacto de la dificultad por la aplicación del FM por vía intravenosa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la relación entre la duración de la transferencia de embriones (medida objetiva de dificultad) con la dificultad subjetiva declarada por el operador.
2. Determinar la relación entre las dificultades registradas en la transferencia de embriones y tasa de preñez.
3. Determinar si la aplicación del Flunixin Meglumine por vía IV o IM es capaz de modificar las relaciones observadas sin su aplicación.

HIPOTESIS

- 1- Existe correlación entre medidas objetivas y subjetivas de la dificultad con la que se transfiere un embrión.
- 2- Existe correlación entre la dificultad en la transferencia de un embrión y las probabilidades de su sobrevida.
- 3- El FM aplicado por vía intravenosa al momento de realizar la TE permite mejorar las tasas de preñez cuando hubo dificultades en la manipulación.



CAPITULO III: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. GENERALIDADES

El alto porcentaje de mortalidad embrionaria durante los primeros días de gestación se considera la causa principal de una baja eficiencia reproductiva; es por este motivo que se ha considerado que la transferencia de embriones provenientes de bovinos con altas tasas de fecundidad es una gran alternativa para asegurar el éxito de la gestación y el nacimiento de una cría saludable (Sartori & Nunes, 1995).

La transferencia de embriones es una de las biotecnologías más utilizadas a nivel mundial. Lo que se pretende lograr con la misma es aumentar la producción del número de crías de alto valor genético; así como difundir las mismas alrededor del mundo (Baruselli et al., 2006).

La SOTE (superovulación y transferencia de embriones) es una técnica mediante la cual los embriones son colectados de una hembra donante previamente tratada para aumentar el número normal de ovulaciones, que luego son transferidos a una hembra receptora que será la responsable de gestar y parir la cría.

Al principio de los años 70 comenzó el gran interés comercial en la transferencia de embriones bovinos y en el año de 1973 se realizó la primera transferencia exitosa de un embrión congelado; como lo mencionan Bó et al. (2002) hoy en día se realizan más de 500 mil transferencias anuales de embriones bovinos en todo el planeta.

El procedimiento en bovinos desde ya hace muchos años es no quirúrgico (Elsden, Hasler, & Seidel, 1976), y los embriones se pueden mantener almacenados indefinidamente mediante la criopreservación en nitrógeno líquido (Arriaga, 2010).

Como se señaló anteriormente, la técnica consta de dos etapas críticas: la superovulación y colecta de los embriones producidos por las donantes, buscando conseguir un mayor número de embriones que tengan un buen desarrollo, y en segundo lugar, su transferencia a las receptoras, que deberán encontrarse en excelente condición corporal y de salud, para garantizar un mayor porcentaje de preñez (Alberio, 1993).

Durante el procedimiento de transferencia de embriones se realiza manipulación del tracto reproductivo produciéndose liberación de PGF2 α , la cual inducirá la luteolisis; al iniciarse este proceso ocurre una baja en la concentración de progesterona (P4) ocasionándose como consecuencia un aumento de estrógenos (E2) que van a estimular la expresión de los receptores de oxitocina, y a través de estos últimos, la producción de prostaglandinas (Cardoso, 2009; Perez García, 2001; Pinto et al., 2008).



Es por este motivo que se ha propuesto el tema de este estudio, ya que plantea que la inhibición de la liberación de la PGF2 α podría explicar el aumento del porcentaje de preñez.

Estudios demostraron que la tasa de preñez puede disminuir cuando aumenta el tiempo de duración de la transferencia de embriones así como la dificultad de la misma; esto sería debido a la liberación de PGF2 α inducida por la manipulación prolongada del útero (Rossetti et al., 2011).

La administración FM como agente antiluteolítico para evitar la regresión prematura del cuerpo lúteo en cabras ya se encuentra bien definido (Soares et al., 1998); a diferencia del ganado bovino que no se conoce con exactitud los resultados obtenidos sobre la regresión del CL, cuando es administrado este fármaco (FM) por diferentes vías.

Como lo manifiesta Aké-López (2002), la manipulación del embrión para realizar la transferencia del mismo podría comprometer su desarrollo, y como consecuencia habría un reconocimiento tardío de la gestación, motivo por el cual se considera factible utilizar un antiprostaglandínico como el FM.

3.2. SUPEROVULACIÓN

En la superovulación y transferencia de embriones el primer paso es la elección de la donante, es decir, escoger la hembra con el potencial genético que queremos reproducir. Para esto, es necesario tomar en cuenta algunos parámetros en la selección antes de iniciar un programa de superovulación (SOV) y así tener una respuesta superovulatoria efectiva. Selk (1991) planteó varios elementos para la selección como: las donantes deben haber comenzado a ciclar de forma regular cuando empezaron la pubertad, no presentar más de dos servicios por concepción, que tengan un rendimiento productivo por encima de la media, que en su historial no hayan presentado problemas reproductivos o en el parto y que no tengan defectos de conformación o genéticos. Asimismo, Jiménez (2009) propuso factores de exclusión para no seleccionar como donantes animales viejos, que tengan menos de 60 días postparto, de baja condición corporal, que en el momento de la selección estén padeciendo de alguna enfermedad y animales con un historial de mala respuesta superovulatoria o que no produjeron embriones transferibles.

El siguiente paso es la SOV propiamente dicha; en las hembras *Bos taurus* existen un número considerable de folículos que emergen con cada onda folicular y que con la aplicación de gonadotrofinas es posible estimular el crecimiento de los mismos que pueden llegar a ovular (Barros & Nogueira, 2001)., esto se conoce como superovulación que según Palma et al. (2008) es efectiva cuando se produce la ovulación de dos o más folículos.



Se ha demostrado que solo alrededor del 68% de las vacas sometidas a superovulación han tenido respuesta positiva en cuanto a la producción de embriones transferibles, el 1% de vacas no se pudo colectar, 7% de los animales no respondieron a las SOV, en otro 7% no se colectó ninguna estructura y un 17% de las vacas no tuvieron embriones trasferibles. (Donalson, 1984).

Para lograr la superovulación en bovinos varias drogas han sido probadas; entre las efectivas están la Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) y la Hormona Folículo Estimulante de origen porcino (FSH-p) (Mapletoft & Bó, 2011). La FSH-p ha presentado la ventaja que ha producido 3.8 más embriones que la eCG (Elsden, Nelson, & Seidel, 1978), sin contar los efectos colaterales (Mapletoft, Bennett Steward, & Adams, 2002) debido a su vida media larga, ya que la eCG puede estar en circulación hasta 10 días después de su aplicación y puede provocar respuestas no deseadas (Boland, Goulding, & Roche, 1991).

Existen varios tratamientos o protocolos para superovular vacas. Uno de los más usados consiste en colocar un dispositivo intravaginal de progesterona y benzoato de estradiol el Día 0, a partir del día 4 inyectar la FSH-p dos veces al día durante cuatro días en dosis decrecientes, es decir, un total de 8 aplicaciones. Junto con la quinta y sexta dosis de FSH-p se aplica prostaglandina (PGF2 α) y el implante es retirado en el momento de la segunda PGF2 α . En el día 8 y 9 se detecta el celo y las inseminaciones se llevan a cabo a las 12 y 24 horas de la manifestación del celo (Bo, Adams, Pierson, & Mapletoft, 1996).

3.3. COLECTA DE EMBRIONES

El lavado y recuperación de embriones para su calificación y transferencia o criopreservación se realiza a los 7 días de la primera IA.

Para realizar el lavado se utiliza una sonda Foley guiada por un mandril con la que se atraviesa el cérvix y es llevada al cuerno uterino en el que es fijada inflando el balón de la sonda con aire (Gráfico 1), el volumen de aire depende del diámetro del cuerno. Una vez fijada la sonda en el tercio medio del cuerno, ésta es conectada a un tubo "Y" que por un extremo tiene conectado a su vez un filtro en el que se retendrán los embriones y que se ubica a nivel del piso y por el otro extremo el medio de colecta que generalmente es PBS precalentado a la temperatura corporal de la vaca y debe estar elevado a una distancia de un metro de la donante (Gráfico 2). Éste procedimiento se repite en el otro cuerno. Una vez realizado el lavado de los dos cuernos, el líquido recuperado se coloca en una caja petri cuadrículada para la búsqueda de estructuras (ovocitos y embriones) en una lupa estereoscópica con magnificación de 20x. Luego se aíslan todas las estructuras encontradas y se los coloca en un medio "holding" o de mantenimiento hasta terminar la búsqueda y proceder con la clasificación (Lindner &

Wright, 1983).

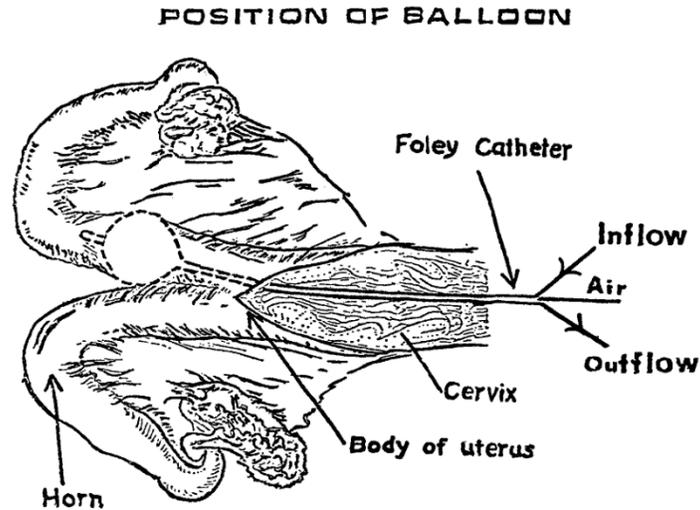


Gráfico 1.- Posición del balón para realizar el lavado de embriones en vacas donantes. (Elsden et al., 1976)

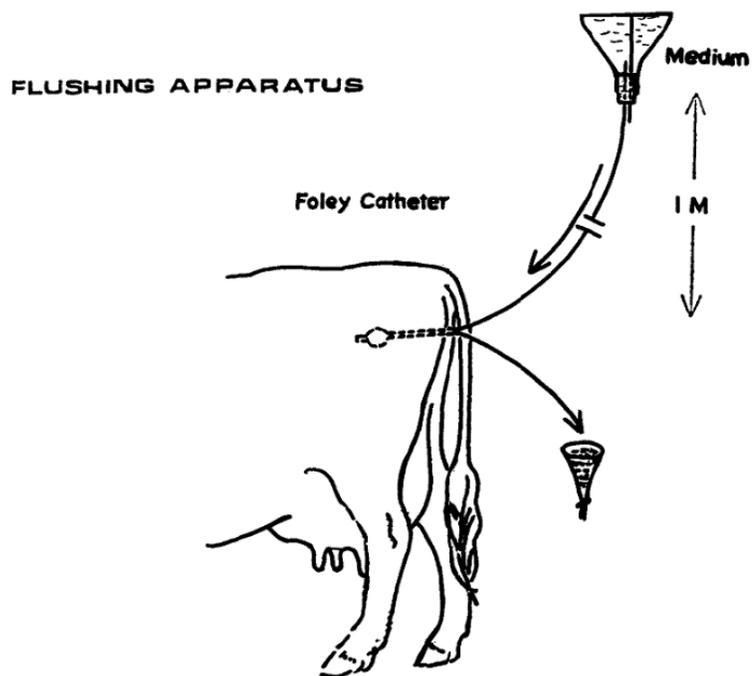




Gráfico 2.- Lavado de embriones de vacas donadoras. (Elsden et al., 1976)

3.4. CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES

Es fundamental realizar una adecuada evaluación de los embriones a transferir ya que de ello depende el éxito de la transferencia; se considera que tienen una mayor probabilidad de implantarse los embriones calificados como excelentes o buenos en comparación con los calificados como malos. Se debe tomar en consideración también algunos factores que van a estar relacionados con el porcentaje de preñez, ya que estos podrían modificar el éxito de la misma (Cutini, Teruel, & Cabodevila, 2000).

Para la calificación de los embriones recuperados se toman los parámetros mundialmente aceptados por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), que evalúa aspectos relacionados con su estado de desarrollo, es decir, la edad del embrión en días desde su fertilización y está determinado de la siguiente forma:

N° Estado de Desarrollo

- 1.- No Fecundado
- 2.- 2 a 12 células
- 3.- Mórula Temprana
- 4.- Mórula
- 5.- Blastocisto Temprano
- 6.- Blastocisto
- 7.- Blastocisto Expandido
- 8.- Blastocisto Eclosionado
- 9.- Blastocisto Eclosionado Expandido

Para determinar la calidad de los embriones se tomaron en cuenta factores relacionados con la forma, tonalidad, apariencia, simetría, integridad de la zona pelúcida y la proporcionalidad de compactación de los blastómeros (Callejas et al., 2008).

Lindner & Wright (1983) y Cutini et al. (2000), manifiestan que actualmente varios autores prefieren calificar a los embriones en la escala del 1 al 4, siendo estos considerados como:

Código	Calidad
Código 1	Excelente o Bueno
Código 2	Regular



Código 3 Malo
Código 4 Muerto o Degenerado

Se considera embriones transferibles a los que por su desarrollo se encuentran en estadio de mórula, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido (Wright, 1981) y con códigos de calidad 1 y 2 (excelentes o buenos y regulares, respectivamente). Estos tienen el 50% de probabilidades de desarrollarse y de alcanzar el nacimiento así como también podrían ser criopreservados en caso de no contar con receptoras.

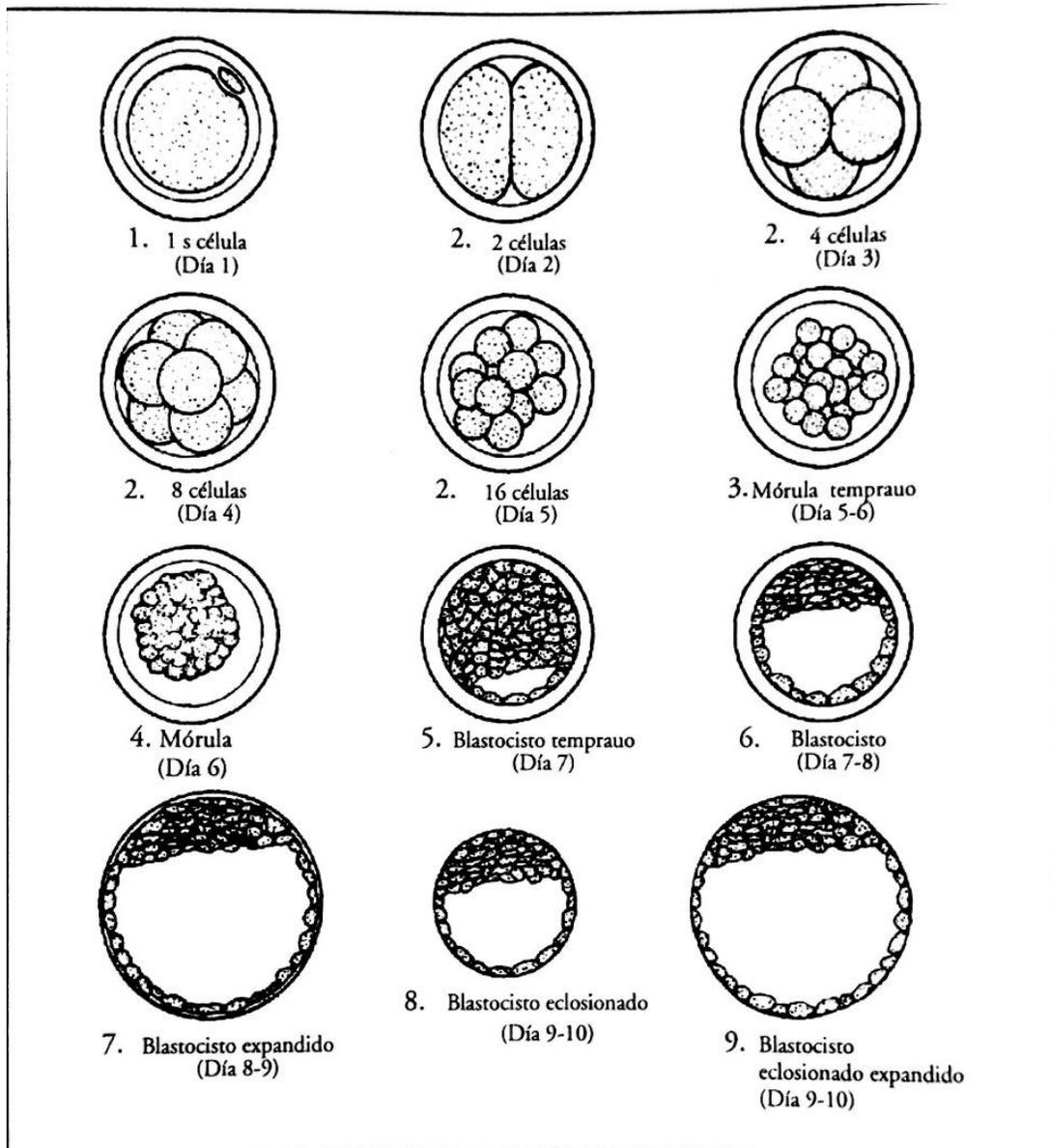


Gráfico 3.- Estadios de desarrollo de los embriones (Stringfellow & Seidel, 2000).

Hasler (2012) indica que los tres criterios más importantes relacionados con morfología del embrión son la edad, el estadio y la calidad; a diferencia de Cutini et al. (2000) que indicaron que se han realizado numerosas investigaciones pretendiendo determinar el estadio óptimo del embrión para efectuar la transferencia, obteniéndose un sin número de resultados diferentes. Cutini et al. (2000); Hasler et al. (1995); Ling et al. (1995) indicaron que lo más importante para la implantación es la edad embrionaria, encontrándose también con resultados diversos.



En nuestra investigación las transferencias se realizaron con embriones de 7 días de edad; en estadios de blastocistos y mórulas que presentaron calidad 1 y 2.

Autores	Calidad embrionaria	Embriones transferidos n	Receptoras preñadas	
			n	%
Wright (116)	buena	1748	1122	64,2 ^a
	regular	438	198	45,2 ^b
	pobre	100	33	33,0 ^c
Hasler y col. (36)	buena	5521	4037	73,1 ^a
	regular	304	181	59,5 ^b
	pobre	76	31	40,8 ^c
Reinchenbach y col. (91)*	excelente y buena	61	33	54,1 ^a
	regular	41	21	51,2
	pobre	27	7	25,9 ^b
Hasler y col. (37)*	excelente y buena	1802	1035	57,4 ^a
	regular	441	184	41,7 ^b

a, b, c diferencias significativas (p< 0,05)

* Embriones producidos *in vitro*

Gráfico 4.- Efecto de calidad embrionaria sobre el porcentaje de preñez (Cutini et al., 2000).

3.5. RECEPTORAS

3.5.1. SELECCIÓN DE RECEPTORAS

Por la importancia que tienen las receptoras en los programas de transferencias de embriones se deben considerar varios factores relevantes para su selección ya que de esto dependerá que el éxito de la técnica.

Los factores a considerar son los siguientes:

- Animales sanos reproductivamente.
- Estado nutricional (Condición corporal; $\geq 2,75$ escala 1-5).
- Tener una buena capacidad genética para así poder alimentar a la cría y que la misma pueda expresar todo su potencial genético.
- Tamaño adecuado para evitar problemas al momento del parto.
- Presencia de cuerpo lúteo funcional.

Es recomendable que las receptoras sean animales de la misma hacienda ya que se conoce su historial reproductivo, sanitario, etc. y no animales nuevos en el hato (Cutini et al., 2000).

En un trabajo realizado en el año 1986 por Mapletoft et al., lograron obtener un mayor porcentaje de preñez en receptoras que presentaban una condición corporal entre 2 y 3, en la escala del 1 al 5.



Condición corporal	Receptoras transferidas	
	n	porcentaje de preñez
≤ 1	230	44 ^a
2	460	53 ^b
3	633	55 ^b
≥ 4	175	47 ^a

a, b diferencias significativas ($p < 0,05$)

Gráfico 5.- Efecto de la condición corporal en receptoras de embriones bovinos sobre el porcentaje de preñez (Cutini et al., 2000).

3.5.2. SINCRONIZACIÓN DE CELO EN RECEPTORAS

En los programas de transferencia de embriones las receptoras representan un costo alto debido a la inversión que representa su manutención (alimentación, sanidad, manejo y por la superficie de potreros que necesitan para el consumo de forraje) (Garrote & Scardaccione, 2010).

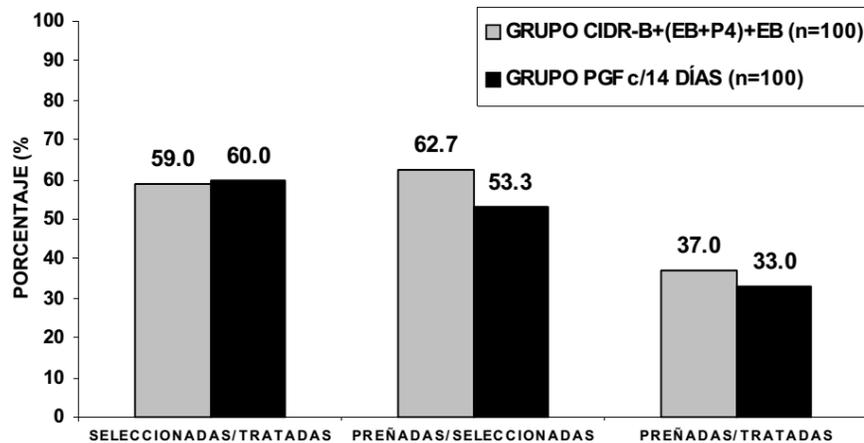
En los programas de transferencias de embriones es necesario realizar la sincronización de celo a las vaconas receptoras eficientemente para lograr mejores resultados y así disminuir los costos implicados (Bó et al., 2002). Según Garrote & Scardaccione (2010), en la actualidad la tasa de preñez en receptoras se ha incrementado a un 70% debido a la utilización del sistema de sincronización a tiempo fijo en los programas de transferencias embrionarias; con éste sistema no es necesaria la detección de celo de las receptoras (Bó, Moreno, Cutaia, & M, 2004).

Existen diferentes protocolos de sincronización que se pueden ser utilizados. La aplicación de dos dosis de PGF2 α con intervalo de 11-14 días, requiere la detección de celo, pudiendo conllevar a la frecuente ocurrencia de los mismos en horas de la noche y madrugada; su manifestación dependerá del momento de la aplicación de la PGF2 α con relación al estado de desarrollo del folículo dominante (momento de celo y ovulación) (Bó et al., 2004).

Existen también programas de sincronización de celo y ovulación que no requieren la identificación del mismo, consiste en la combinación de estrógenos y progesterona, que aplicados de la forma indicada ayudarán en el desarrollo folicular debido a su acción sobre las gonadotrofinas (Bó et al., 2004).

Uno de estos protocolos consiste en la colocación de un dispositivo intravaginal (DIV) de P4 y 2 mg de benzoato de estradiol (BE IM) el día de inicio del tratamiento (D0). Siete días mas tarde se retira el DIV y se aplica una dosis luteolítica de PGF2 α . El día 8 se inyecta 1 mg de BE con la finalidad de reforzar la inducción de la celo y sincronizar

la ovulación (Bó et al., 2004).



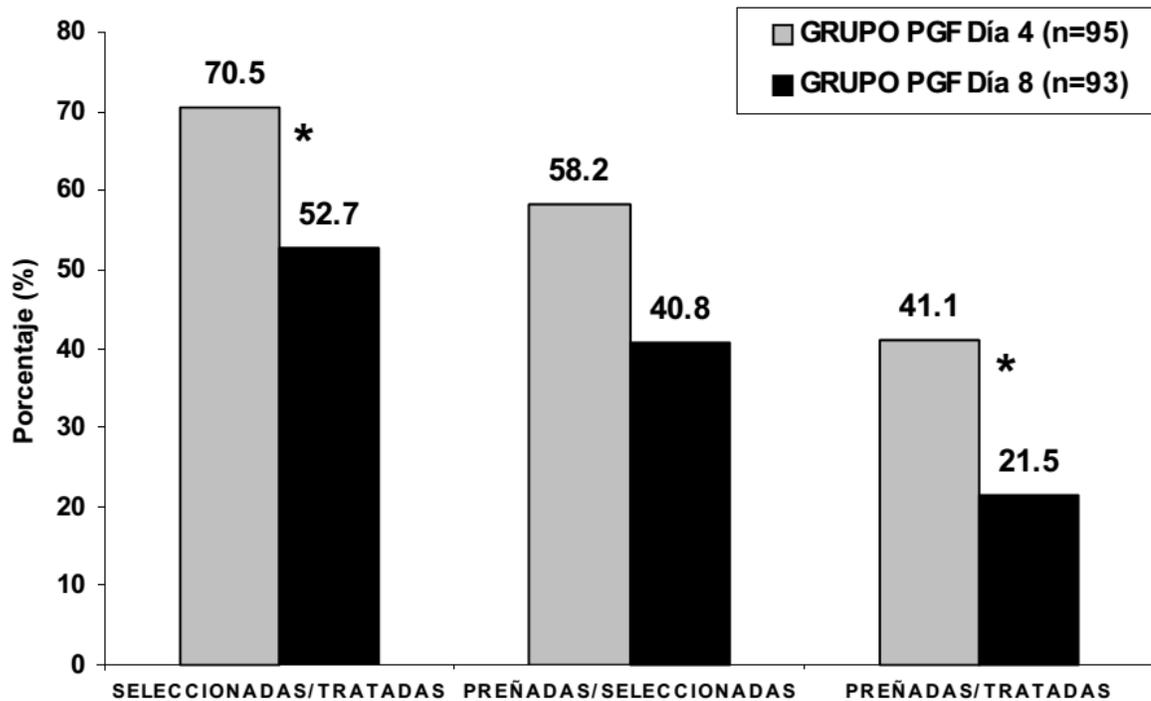
Los porcentajes no difieren ($P > 0,6$).

Gráfico 6.- Porcentaje de preñez en receptoras tratadas con un implante de P4 que fueron transferidas a tiempo fijo y de receptoras tratadas con PGF2 α y transferidas a los 7 días luego de que se ha observado el celo (Bó et al., 2004).

Según Nasser et al. (2004), estudios previos demuestran que los protocolos de sincronización para receptoras a base de progesterona, a los que se les ha adicionado eCG dos días antes de retirarse la fuente de P4 presentaron un mayor porcentaje de preñez luego de la transferencia del embrión; esto es debido a que se estimula el crecimiento de un folículo dominante de mayor tamaño, que producirán más P4 luego de la ovulación, se convierta en un cuerpo lúteo funcional que creará un ambiente uterino más adecuado para el embrión y mejorará el proceso de reconocimiento materno de la preñez.

Estudios realizados por Bó et al. (2004); y Moon et al. (2004), demostraron que si se adelanta la aplicación de prostaglandina del día 8 al día 4 tendremos un folículo preovulatorio de mayor tamaño, una ovulación sincrónica y más temprana, así como mayor concentración plasmática de P4 al momento de la transferencia de los embriones.

Estudios demuestran que un mayor tamaño del folículo ovulatorio estará directamente relacionado con la presencia de un CL que producirá mayores concentraciones de P4 y, por lo tanto, mejores resultados de preñez.



* Porcentajes difieren $P < 0,02$

Gráfico 7.- Efecto del momento de aplicación de la PGF sobre el porcentaje de preñez en vacas receptoras de embriones y porcentaje de preñez en vacas tratadas con dispositivos intravaginales de P4 y estrógenos (Bó et al., 2004)

Tabla 1 .-Media del número de CL y el porcentaje de preñez (%) en receptoras tratadas con un dispositivo de P4 intravaginal simultáneamente con 2 mg de BE intramuscular con o sin 50 mg de progesterona por vía intramuscular el día cero, 400UI de eCG y 0,15 mg de D-cloprostenol por vía intramuscular colocado el día 5 u 8 del tratamiento (Nasser et al., 2004)



Day 0	eCG	N	Transferred/ treated (%)	Pregnant/ transferred (%)	Pregnant/ treated (%)	CL numbers
EB	Day 5	75	68/75 (90.7)	38/68 (55.9)	38/75 (50.7)	1.32 ± 0.12 ^a
	Day 8	75	62/75 (82.7)	30/62 (48.4)	30/75 (40.0)	1.03 ± 0.02 ^b
EB + P4	Day 5	76	67/76 (88.2)	33/67 (49.3)	33/76 (43.4)	1.37 ± 0.12 ^a
	Day 8	75	65/75 (86.6)	31/65 (47.7)	31/75 (41.3)	1.22 ± 0.07 ^{a,b}
Main effects						
	Day 5	151	135/151 (89.4)	71/135 (52.6)	71/151 (47.0) ^c	1.35 ± 0.08 ^e
	Day 8	150	127/150 (84.7)	61/127 (48.0)	61/150 (40.7) ^d	1.13 ± 0.04 ^f
EB		150	130/150 (86.7)	68/130 (52.3)	68/150 (45.3)	1.19 ± 0.06
EB + P4		151	132/151 (87.4)	64/132 (48.5)	64/151 (42.4)	1.30 ± 0.07

a, b, e, f son diferentes ($P < 0,05$), c y d son diferentes ($P = 0,1$)

3.6. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La transferencia de embriones puede realizarse de dos formas: quirúrgica y no quirúrgica; debido a que las transferencias realizadas en esta investigación fueron no quirúrgicas la descripción se centrará en ésta.

La transferencia de embriones no quirúrgica se realiza depositando el embrión en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo (Cardoso, 2009), mediante la introducción de un catéter que contiene al embrión en una pajuela. El catéter es guiado por vía transrectal lo que implica que exista una manipulación del cérvix uterino y eventualmente del cuerno donde se deberá introducir el catéter y depositar el embrión.

Okada et al. (2016) manifiestan que el bajo porcentaje de preñez en receptoras puede ser debido a la contaminación del útero que se podría producir al momento de realizar la transferencia, así como debido a la manipulación del tracto genital durante la maniobra, que causaría la liberación de suficiente cantidad de PGF2 α como para causar la luteólisis y la muerte embrionaria.

Con respecto a la dificultad de la transferencia, en el primer trabajo realizado por Gordon (1976) se demostró que cuando la transferencia se demoraba más allá de los 3 minutos, se disminuía la tasa de preñez. En otros trabajos realizados en la misma época se pudo conocer un poco más sobre este aspecto, ya que Tervit et al. (1980) observaron que la preñez tendió a ser afectada linealmente por el tiempo necesario para realizar la transferencia, que vario entre 0.7 a 6.3 minutos con un promedio de 1.8 minutos (108 seg). Sin embargo en este trabajo no se dan detalles de la forma en que se determinó este tiempo ni de como se hizo el análisis de esta información. Por otro



lado, se menciona que si la maniobra es llevada a cabo con torpeza se provoca irritación del endometrio, que puede conducir a una disminución del éxito de la transferencia. De acuerdo con estos trabajos en los cuales la variable dificultad de la transferencia (objetiva o subjetiva) fue evaluada de manera insuficiente y en forma aislada, es por esto que se propone en este estudio recabar con mayor precisión la información para mejorar los resultados de transferencia.

Recientemente, Scenna et al. (2005), realizaron un trabajo en el que consideraron con mayor precisión sobre la variable subjetiva e incluyeron en el estudio tres grados de dificultad:

- **Primer grado (sin dificultad):** Mínima manipulación del tracto genital de la vaca y depositando el embrión en el tercio superior del cuerno uterino ipsilateral a la presencia del CL.
- **Segundo grado (dificultad media):** Manipulación media del tracto genital y también depositando al embrión en el tercio superior del cuerno uterino ipsilateral a la presencia de CL.
- **Tercer grado (gran dificultad):** Mucha manipulación del tracto genital, depositando el embrión en la porción media del cuerno uterino ipsilateral a la presencia del CL. (Scenna et al., 2005).

Al momento de realizar las maniobras en la transferencia de embriones se liberan prostaglandinas que producen inflamación en las células, y al mismo tiempo, generan contracciones uterinas ocasionando un efecto nocivo para la implantación del embrión; hoy en día existe evidencias que la administración de productos que inhiben las ciclooxigenasas podrían mejorar el porcentaje de preñez al realizarse transferencias de embriones, favoreciendo la implantación de los mismos; de la misma manera si se aplican estos inhibidores en los medios de producción in vitro de embriones mejorarán los procesos de fertilización (Elli et al., 2001).

Scenna (2005) determina que de acuerdo con esta calificación, a mayor dificultad existió mayor manipulación y por consiguiente aumento del nivel de PGF2 α producida, pero posteriormente no relaciona esta dificultad con éxito en la TE.

Es de suma importancia la experiencia del operador al momento del depósito del embrión; ya que el tiempo que transcurre en atravesar el cuello uterino y depositar el embrión, dependerá del grado de dificultad que se presenta para atravesar el cérvix; estudios han demostrado que existe una relación negativa con el porcentaje de preñez (Cutini et al., 2000).

Se ha demostrado que el embrión debe depositarse en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo lo que ayudará al reconocimiento materno para la gestación (Cutini et al.,



2000).

Esta situación de dificultad, ya sea medida objetiva o subjetivamente provoca la mencionada secreción de PGF 2α , y consecuentemente, la regresión prematura del CL y disminución de la progesterona plasmática provocando además contracciones del miometrio que actuando en forma conjunta con la oxitocina inducirían muerte y reabsorción embrionaria (Echeverría, 2006).

El sitio donde se deposite el embrión es fundamental, ya que con esto buscamos maximizar de cierta forma el porcentaje de preñez; es sabido que los embriones bovinos deben ser depositados en el cuerno uterino ipsilateral a la CL. Se han realizado investigaciones referentes a los porcentajes de preñez obtenidos de acuerdo al lugar del depósito del embrión, obteniéndose un 69,6% de preñez cuando el embrión fue depositado en la parte superior; 68,8% cuando fue depositado en la parte media del cuerno y 59,8% cuando se colocó en el tercio inferior del mismo (Steel, no publicado; nombrado por Hasler, 2012).

Se podría mencionar que los factores más importantes y que pueden tener influencia en el porcentaje de preñez en una transferencia de embriones son:

- Depósito del embrión en el útero.
- Experiencia del operante.
- Protección del equipo de transferencia.
- Aplicación de anestesia epidural, y en caso de requerirse un sedante para hembras nerviosas (Cutini et al., 2000).

Hasler (2012) indica que cuando los embriones transferidos son de calidad 1 no existe influencia del sitio de depósito del embrión, a diferencia que cuando los embriones eran de calidad 2 y 3 el porcentaje de preñez se encontraba disminuido si se realizaba el depósito en el tercio inferior del cuerno del útero.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, resulta de interés realizar un estudio en el cual puedan llegar a utilizarse tanto medidas de tipo subjetivo como objetivo, que en su conjunto, permitan prever cual es la consecuencia sobre la tasa de preñez.

Pero también esto servirá para precisar si la aplicación de un antiprostaglandínico, es capaz de modificar estas respuestas negativas.

3.7. PROSTAGLANDINAS

3.7.1. PROSTAGLANDINA F 2α

Algunos trabajos han mostrado que la manipulación del tracto genital produce un



traumatismo que provoca un incremento en la producción de PGF2 α en la luz uterina (Buford et al., 1996; Scenna et al., 2005), lo cual fue asociado con efectos negativos en la sobrevivencia embrionaria y en el porcentaje de preñez en bovinos (Buford et al., 1996; Cardoso, 2009; Kim et al., 2014).

Psychoyos et al. (1995), indicaron que en varias especies, las células epiteliales y del estroma del endometrio son capaces de producir las prostaglandinas a través de la vía de la ciclooxigenasa.

Cardoso (2009), indicó que cualquier hecho que permita liberación de PGF2 α va a causar la luteólisis y por consiguiente una pérdida gestacional.

La prostaglandina F2 α , actúa de forma muy activa sobre el cuerpo lúteo, ya que promueve la vasoconstricción de los vasos que se encuentran irrigando las células lúteas y como consecuencia se produce la luteólisis (Pinto et al., 2008); la misma es secretada en forma pulsátil por el endometrio bovino al final del diestro.

La luteólisis es caracterizada por un rápido descenso de progesterona (P4) luego de las 8 a 12 horas que ha empezado la liberación de PGF2 α (Cardoso, 2009); es decir la secreción prematura de PGF2 α va a producir una fase lútea corta (Schrick, Inskeep, Butcher, & Virginia, 1993a).

Estudios revelan que concentraciones elevadas de PGF2 α en sangre afecta directamente la funcionalidad del cuerpo lúteo así como la calidad y el desarrollo del embrión; inclusive se ha visto alterada la capacidad embrionaria para efectuar la extrusión del embrión de la zona pelúcida (Buford et al., 1996; Elli et al., 2001; Hockett, Rohrbach, & Schrick, 2004; Schrick et al., 1993).

Concentraciones elevadas de PGF2 α en el útero están asociadas a una baja calidad del embrión, así como a una menor supervivencia del mismo (Hockett et al., 2004). Kim et al. (2014), indicaron que existen investigaciones que demuestran que al producir embriones in vitro y al adicionar PGF2 α al medio de cultivo se produce una inhibición en el desarrollo de los embriones bovinos, de conejo y de rata.

La PGF2 α cumple algunas actividades, entre ellas está regular el tiempo de vida del cuerpo lúteo, produce contracciones de la musculatura lisa del útero y a la vez genera una dilatación del cuello uterino (Echeverría, 2006).

Estudios han demostrado que cuando se superovulan vacas luego de un parto y existen altas concentraciones de $\text{PGF}_2\alpha$ en el útero de la misma, los embriones obtenidos tienden a ser de baja calidad (Kim et al., 2014).

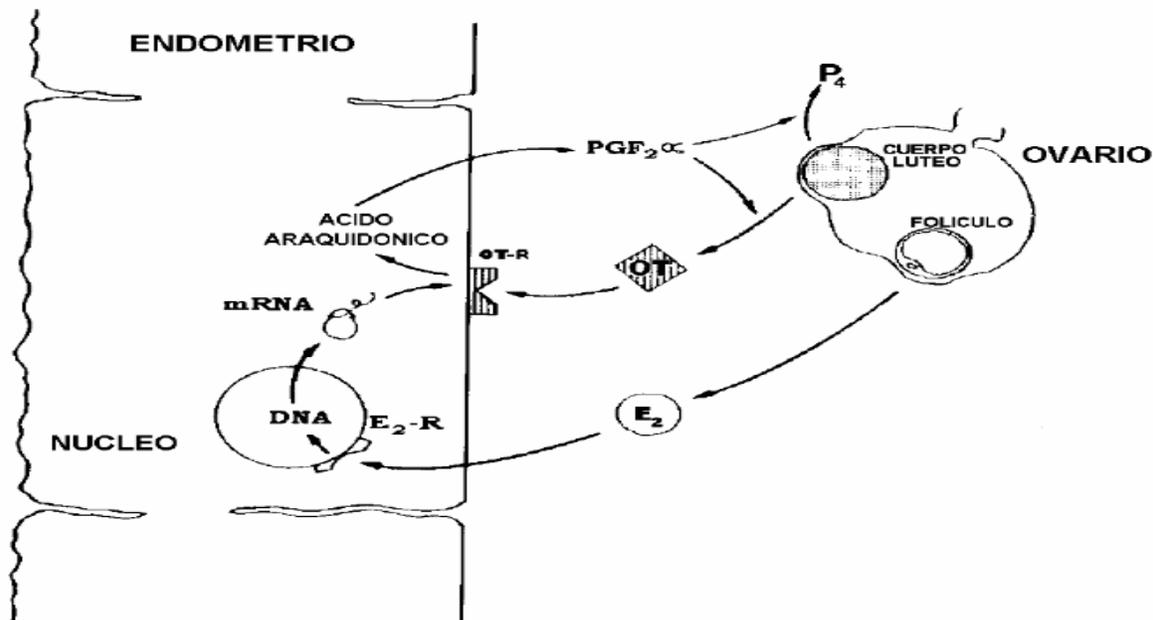


Gráfico 8.- Representación sistemática de la síntesis de la Prostoglandina $\text{F}_2\alpha$. $\text{PGF}_2\alpha$ = Prostoglandina $\text{F}_2\alpha$; OT= Oxitocina; E_2 = Estradiol; P_4 = Progesterona; $\text{E}_2\text{-R}$ = Receptor para estradiol; OT-R= Receptor para Oxitocina (Aké-López, 2002)

Como lo menciona Psychoyos et al. (1995), la prostaglandina E juega un papel importante en la implantación del embrión, ya que en el endometrio a nivel del estroma existen puntos específicos para la unión de la progesterona dependiente de la prostaglandina E; más no para la $\text{PGF}_2\alpha$.

3.7.2. EFECTO DE LA PROSTAGLANDINA EN LA IMPLANTACIÓN DEL EMBRIÓN

La $\text{PGF}_2\alpha$ así como la PGE son dos de las prostaglandinas que presentan una íntima relación con la reproducción de los mamíferos; las dos pueden ser liberadas como consecuencia de varios estímulos, como por ejemplo endócrinos y físicos (Resende, 2009).

Al momento de realizar la transferencia de embriones se efectúa manipulación del tracto reproductivo, y por consiguiente se produce una lesión del mismo, manifestándose como consecuencia un proceso de inflamación; durante la inflamación actúan muchos mediadores químicos tales como varias citoquinas y prostaglandinas,



las mismas que se liberan en el sitio de la lesión afectando la implantación del embrión (Scenna et al., 2005).

Se ha mencionado que cuando existe un aumento de las concentraciones de los mediadores de la ciclooxigenasa en el útero afectará la implantación del embrión ya que producen la activación de las células inflamatorias y estimulan las contracciones uterinas (Moon et al., 2004; Rubinstein, Marazzi, & Polak de Fried, 1999). Sustancias derivadas de la actividad de la ciclooxigenasa poseen un papel muy importante en la vascularización del endometrio, la eclosión del blastocisto e implantación del embrión, (Elli et al., 2001), una vez que se produce la liberación del tromboxano₂ afectará directamente la implantación debido a que éste tiene un efecto trombótico que reducirá el flujo sanguíneo uterino y la perfusión tisular (Rubinstein et al., 1999). Concentraciones lumbales uterinas de PGF₂ α está relacionada con la mortalidad de los embriones (Schrick et al., 1993a).

Estudios de producción de embriones in vitro han demostrado que cuando en el medio de cultivo se adiciona PGF₂ α influye de una manera negativa a comparación de cuando es adicionado FM al medio de cultivo (Kim et al., 2014). La PGF₂ α tiene un efecto tóxico en el embrión, presentando por lo tanto un efecto negativo sobre la calidad del mismo; así también se reporta una correlación negativa entre la concentración de PGF₂ α y la calidad de los embriones. En embriones de conejo producidos in vitro se determinó que la PGF₂ α reduce la cantidad de mórulas y blastocistos tempranos (Pérez, 2001).

3.8. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES):

Estos fármacos conocidos como AINES son los que impiden la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos. También son responsables de la inhibición de la ciclooxigenasa; la misma se encuentra dividida en ciclooxigenasa1 (COX1) y ciclooxigenasa 2 (COX2) (Moon et al., 2004; Resende, 2009; Rubinstein et al., 1999).

Las ciclooxigenasas actúan directamente sobre el ácido araquidónico provocando dos acciones: oxigenando y produciendo una estructura en anillo formando así el endoperóxido cíclico PGG₂ y una actividad de peroxidasa transformando el PGG₂ en PGH₂. Los endoperóxidos mediante acción enzimática se transforman en diversos productos que incluyen prostaglandinas (PGE₂, PGF₂ α , PGD₂, PGI₂) y tromboxanos (Pérez, Cartaya, Valencia, Sanjurjo, & Ilisástigui, 1998).

- COX 1 es una enzima que puede ser producida en muchos tejidos incluyendo sangre, plaquetas; así como ayuda en el mantenimiento de la mucosa gastroduodenal, homeostasis del tejido, homeostasis vascular, agregación



plaquetaria y el flujo plasmático renal; se le considera responsable de la producción de prostaglandinas (Belo & Andrade Pinto, 2013; Resende, 2009).

- COX 2 es una enzima que está relacionada directamente con los procesos inflamatorios y específicamente involucrada en la síntesis de PGF2 α (Resende, 2009).

Los AINES actúan en el proceso de reducción de la reacción inflamatoria mediante la inhibición de COX2 logrando la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Belo & Andrade Pinto, 2013).

Rubinstein et al. (1999) mencionaron que al utilizar un AINE en humanos los porcentajes de implantación de embriones fueron significativamente mayores (17,8%) a comparación del grupo control (9,2%).

En estudios realizados en humanos se pudo observar un aumento en el porcentaje de embarazo luego de realizar transferencia de embriones utilizando un AINE (piroxicam) (Moon et al., 2004).

3.8.1. FLUNIXIN MEGLUMINE (FM)

En general, la implantación del embrión es el paso más crítico para que se pueda obtener una preñez en la transferencia de embriones, es por este motivo que hoy en día existen muchas investigaciones direccionadas a tratar de conseguir facilitar este paso (Elli et al., 2001).

Pinto et al. (2008) mencionan que uno de los mecanismos del reconocimiento materno consiste en la inhibición de la síntesis de la prostaglandina, como consecuencia se detiene el metabolismo del ácido araquidónico y no se forma la PGF2 α ; el cuerpo lúteo se mantiene y por ende la concentración de la progesterona se mantiene en un nivel óptimo para permitir el establecimiento de la preñez.

El flunixin meglumine, es un antiinflamatorio no esterooidal y no narcótico, muy potente con actividad antiinflamatoria y antipirética; actúa inhibiendo la ciclooxigenasa (COX 2) que participa en la conversión de ácido araquidónico a PGF2 α (Geary, Ansotegui, MacNeil, Roberts, & Waterman, 2010; Kim et al., 2014).



El efecto de acción del FM es de entre 1,6 a 3,5 horas; debido a su unión con las ciclooxigenasas puede tener un periodo terapéutico de hasta 24 horas (Aké-López, 2002)

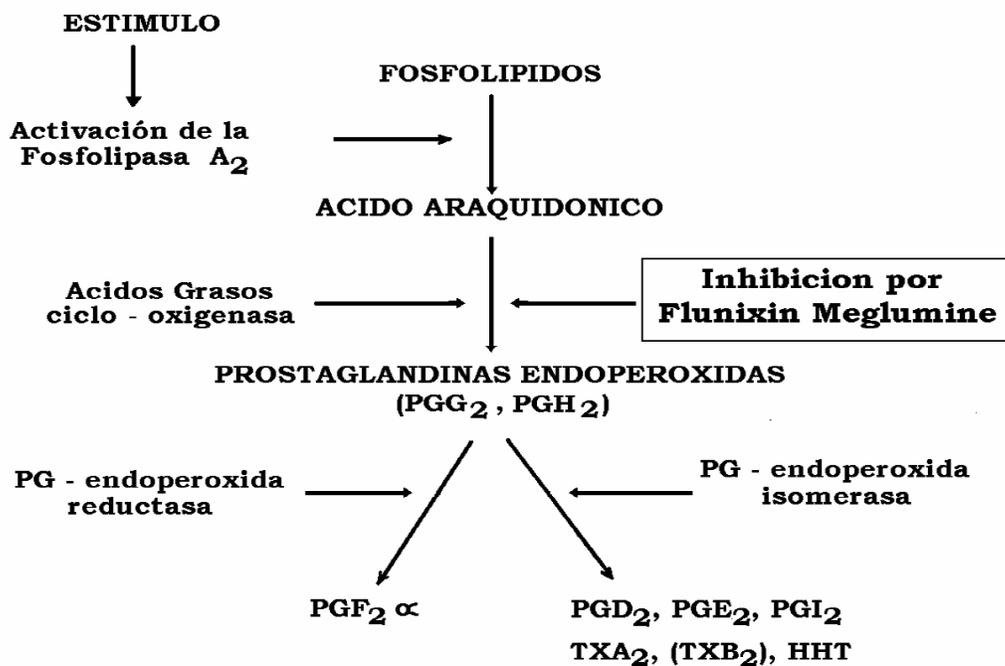


Gráfico 9.- Representación de la cascada que conduce a la producción de las prostaglandinas; se indica el sitio de acción del flunixin meglumine para inhibir la síntesis de las mismas. (Aké-López, 2002)

Se ha tratado de utilizar ciertas estrategias mediante la utilización de productos antiluteolíticos en las receptoras, tales como el uso de FM que tiene como objetivo bloquear la síntesis PGF₂α con el propósito de aumentarlas tasas de preñez, logrando una disminución de la acción luteolítica del útero; es por este motivo que se ha propuesto la utilización del mismo en programas de transferencia de embriones (Farias et al., 2013).

El uso de este tipo de drogas ha producido resultados controversiales; en un trabajo realizado por Shcrick et al. (2001), se observó una mejora en la tasa de preñez en los animales inyectados con esta droga, pero en otro realizado sobre una gran cantidad de animales (más de 500) no se observó mejora de la inyección del FM al momento de la TE (Burry, no publicado, mencionado por Hasler, 2012). En casi la totalidad de los trabajos en que se utilizó ésta droga para mejorar la tasa de preñez después de la TE, no fue medido el grado de dificultad de la maniobra por lo que no podríamos afirmar si



es esta dificultad la que genera los problemas relacionados con la preñez.

Solo en el caso del trabajo de Scenna et al. (2005), se estableció una relación entre nivel de dificultad y niveles de PGF2 α . Sin embargo, cuando este autor aplico el FM no lo relacionó con el nivel de dificultad presente en la maniobra. Como consecuencia de ello, en este estudio como en la mayoría de ellos en que se comparan animales tratados vs no tratados, no se determinó si hubo o no dificultad en la transferencia.

Según estudios realizados en sangre por Scenna et al. (2005), se observó que luego de realizada la TE existieron picos de PGF2 α , que se presentaron desde 10 minutos hasta los 130 a 230 minutos de realizada la TE. Por su lado, Kissell et al. (2012), en una investigación realizada en Carolina del Norte, pudieron determinar el comportamiento del FM al ser aplicado por vía IV, IM, y SC. Al momento de aplicar FM IV se presentó un pico del mismo de niveles 5 veces más altos que lo observado en la aplicación vía IM. Luego se presentó con niveles decrecientes alcanzando a las dos horas niveles similares a los de la vía IM y siguió decreciendo de forma similar a la de esta vía. El FM aplicado subcutáneamente presentó un pico con concentraciones menores que las aplicada IM, teniendo a lo largo de su vida útil una baja concentración. De acuerdo con lo mostrado por Scenna et al. (2005), con respecto a la velocidad de secreción de PGF2 α después de la manipulación uterina, y lo mencionado arriba con respecto de la velocidad y nivel del FM según las vías de aplicación, es posible que la vía utilizada por todos los autores que la han empleado no sea la más apropiada para lograr el efecto deseado. Por ello, un segundo aspecto de interés de estudio en este trabajo será determinar si la vía de aplicación produce respuestas diferenciales y si estas tienen vínculo con las dificultades medidas, tal como se describió previamente.

Merrill et al. (2007), demostraron, que la administración por vía intramuscular de flunixin meglumine logró disminuir la concentración de PGF2 α en el suero y aumentó el porcentaje de preñeces en los bovinos.

Estudios realizados por Pinto et al. (2008), demuestran que si bien la utilización de flunixin meglumine no influye en el incremento de la concentración de progesterona durante la fase lútea, permite que la caída de la misma sea progresiva en los animales tratados y no brusca como ocurrió en el grupo testigo, permitiendo así que no se produzca una luteólisis temprana (Aké-López, 2002). Como lo mencionan Aké-López (2002), Aké-López et al. (2011), Geary et al. (2010) la aplicación de FM permitió un alargamiento de la fase lútea y por consiguiente retrasó la luteólisis, suprimiendo la síntesis de PGF2 α y brindando un mayor tiempo para el reconocimiento materno de la gestación y el éxito de la misma.

3.8.2. EFECTO DEL FLUNIXIN MEGLUMINE SOBRE LOS EMBRIONES



En un trabajo realizado por Scenna (2005) no solo fue demostrado que a mayor grado de dificultad en la transferencia realizada se producían incrementos en la secreción de $\text{PGF2}\alpha$ uterina, sino que se logró determinar que inhibiendo esta secreción por medio del flunixin meglumine era posible mejorar la sobrevivencia embrionaria.

El efecto de la tasa de preñez utilizando FM pueden variar en función de la calidad del embrión, la etapa de desarrollo del mismo y el tipo de embriones transferidos (fresco o congelado), según lo confirmado por Scenna et al. (2005).

Según manifiesta Merrill et al. (2007), algunos embriones al ser transferidos no tienen la capacidad de bloquear por completo la secreción de $\text{PGF2}\alpha$ segregada en el útero y esto se traduciría en un menor porcentaje de preñez. Como lo menciona Pérez (2001) para que la gestación se lleve a cabo es necesario que se supriman los pulsos de $\text{PGF2}\alpha$, lo cual inhibirá el aumento de los receptores de oxitocina uterina y aumentará la concentración de P4; las mismas que proporcionará un ambiente fisiológico adecuado para el desarrollo del embrión (Wann & Randel, 1990).

Como lo menciona Carvalho (2009), existen varios estudios que demostraron una estrecha relación positiva entre la concentración de P4 y el desarrollo embrionario; y al contrario una baja concentración de P4 se relaciona con un pobre desarrollo embrionario y un reconocimiento materno de preñez deficiente.

Estudios recientes demostraron que colocando un antagonista del receptor de $\text{PGF2}\alpha$ en el medio de recolección de embriones tuvo un efecto positivo sobre el porcentaje de preñez en las receptoras (Scenna, Edwards, Schuenemann, & Roper, 2007).

Algunos estudios en los que se utilizó FM y se comparó la calidad del embrión encontraron que el tratamiento con FM no afectó las tasas de preñez para los embriones de calidad 1, mejorando solamente las tasas de preñez para los embriones de calidad 2, sugiriendo de esta forma que los embriones de calidad 2 son más sensibles a los efectos nocivos de la $\text{PGF2}\alpha$ (Farias et al., 2013).

Como lo menciona Aké-López (2002), cualquier tratamiento antiluteolítico que se utilice puede permitir un mayor desarrollo del embrión.



CAPITULO IV: METODOLOGÍA

4.1. ANIMALES

Se utilizaron como receptoras 110 vaconas F1, cruce Bos taurus x Bos indicus, en edad reproductiva (18 a 24 meses) con una condición corporal superior a 2,75 (escala de 1-5) en buen estado de salud y clínicamente libres de enfermedades reproductivas, presentando actividad ovárica cíclica. Estos animales se encontraban en tres establecimientos ganaderos en la provincia del Oro en los que se mantuvieron en pastoreo con acceso libre a sales minerales y agua, antes y durante el período experimental.

Para ser utilizadas como receptoras de embriones, las vaconas fueron tratadas mediante el siguiente protocolo de sincronización de celo:

Día 0: Implante de P4 (CIDR) + 2mg de Benzoato de Estradiol

Día 5: PGF2 α (150 μ g)+ 400UI eCG

Día 8: Retiro de Implante + PGF2 α (150 μ g)

Día 9: 1mg de Benzoato de Estradiol

Día 10: Detección de celo

Día 17: Transferencia del embrión previo chequeo del cuerpo lúteo y su ubicación mediante ecografía.

4.2. EMBRIONES

Los embriones fueron obtenidos a partir de vacas superovuladas; las mismas que recibieron el siguiente protocolo para la superovulación con 8 dosis decrecientes de FSH-p (Folltropin®) en una dosis total de 280 mg:

Día 0: Implante de P4 (CIDR) + Benzoato de estradiol (2mg)

Día 4: am: FSH-p / pm: FSH-p

Día 5: am: FSH-p / pm: FSH-p

Día 6: am FSH-p+PGF2a / pm: FSH-p+PGF2a+ retiro del implante de P4

Día 7: am: FSH-p / pm: FSH-p

Día 8: am: CELO / pm: IA

Día 9: am: IA

Día 15: Colecta y transferencia de embriones.

Para la transferencia se utilizaron embriones frescos que por su estado de desarrollo se encontraban en mórula, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido de calidades 1 y 2 (excelentes o buenos y regulares, respectivamente) según la IETS.



Todas las transferencias fueron realizadas por un mismo operador experimentado.

4.3. DETERMINACIONES REALIZADAS

- 1- Para cada transferencia se determinó la duración de la maniobra. Este tiempo fue tomado desde el momento en que el operador comenzó a penetrar el cérvix y finalizó en el momento en que se depositó el embrión. De acuerdo a la duración de cada maniobra se consideraron dos períodos de tiempo; tiempo 1, cuando los valores fueron inferiores o iguales a la mediana (≤ 45 seg.) y tiempo 2, cuando los valores fueron superiores a 45 seg.
- 2- Simultáneamente el operador calificó la dificultad observada en cada transferencia según la categorización utilizada por Scenna et al. (2005).
Dificultad 1: la transferencia requirió mínima manipulación del tracto genital y el embrión fue depositado en el tercio anterior del cuerno ipsilateral al CL
Dificultad 2: la transferencia requirió manipulación moderada del tracto genital y el embrión fue depositado en el tercio anterior del cuerno ipsilateral al CL
Dificultad 3: se requirió extrema manipulación del tracto genital durante la TE y el embrión fue depositado en la mitad o en el tercio anterior del cuerno ipsilateral al CL.
De las 110 transferencias realizadas solo existieron 12 casos con dificultad de tipo 3 (Anexos 7, 8 y 9), debido a que estadísticamente esta cifra no es representativa fueron agrupados con los de dificultad 2, sumando entre ambas dificultades (2+3) un total de 39 transferencias (35% con dificultades entre 2 y 3).
- 3- A todas las vaconas se les realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografía entre 30 y 40 días después de realizada la transferencia y se reconfirmó entre los 60 y 90 días después de la misma.

4.4. TRATAMIENTOS

Las vaconas fueron distribuidas al azar en tres grupos experimentales:

- 1- Control (n= 31): recibieron una inyección de solución fisiológica estéril (equivalente al volumen de FM que se aplicaría considerando el peso del animal) por vía intramuscular inmediatamente luego de la TE.
- 2- Grupo FM-IM (n= 39): recibieron una inyección de 2.2 mg/kg de peso vivo de Flunixin Meglumine por vía intramuscular inmediatamente luego de la TE.
- 3- Grupo FM-IV (n= 40): recibieron una inyección de 2.2 mg/kg peso vivo de Flunixin Meglumine por vía intravenosa yugular inmediatamente luego de la TE.

En la primera fase del estudio se relacionaron las dos modalidades de evaluación (tiempo y dificultad) con la tasa de gestación.



En la segunda fase del estudio se evaluó la tasa de gestación de los animales de los tres grupos experimentales.

De acuerdo con lo anterior, las variables analizadas en todos los casos fueron:

- 1- Duración de la maniobra de TE, medida en segundos con un cronómetro.
- 2- Grado subjetivo de dificultad expresado por el operador entre 1 y 2 (2+3).
- 3- Tasa de preñez en cada uno de los grupos en estudio, confirmada mediante ultrasonografía.

4.5. METODOLOGÍA DE LA TRANSFERENCIA PROPIAMENTE DICHA

4.5.1. Preparación de la Receptora y Transferencia del embrión

- 1.- Se llevaron las receptoras a la manga.
- 2.- Se realizó un chequeo mediante ecografía para determinar la presencia del CL. Se ubicó en cuál de los ovarios estaba el CL y luego se evaluó su calidad (tamaño y forma). Se registró la información
- 3.- Se realizó un lavado de la región perineal y se secó con toallas de papel.
- 4.- Se rasuró y se desinfectó la zona en donde se aplicó la anestesia epidural (5ml de clorhidrato de lidocaína al 2%); se verificó que la cola se encontrase sin movimientos voluntarios; una vez manifestada esta señal se definió que la vaca estaba lista para la TE.
- 5.- En caso de ser necesario se lavó nuevamente la zona perineal.
- 6.- Se cargó la pajuela con el embrión (fresco) en el catéter de transferencia y se colocó una camisa sanitaria como protección.
- 7.- Se procedió a abrir los labios vulvares de la receptora para evitar contaminar la pistola de transferencia, al momento de introducirse.
- 8.- Al llegar al cérvix se perforó la camisa sanitaria, una vez atravesado el cérvix se colocó el catéter en el cuerno ipsilateral al CL, depositando el embrión en el tercio anterior del cuerno. Se registró el tiempo que transcurrió entre la ruptura de la camisa sanitaria (cérvix) y el momento en que se depositó el embrión en el cuerno.
- 9.- Se retiró el catéter de TE; es en este momento se solicitó al operador calificar la transferencia según la dificultad (grados 1 a 3).



10.-Se inyectó el FM (2,2 mg/kg PV IM o IV) dependiendo del grupo experimental correspondiente; en caso del grupo testigo se inyectó solución fisiológica.

11- Entre los 30 y 40 días de realizada la transferencia embrionaria se realizó el diagnóstico de preñez mediante ecografía.

12.- Entre los 60 y 90 días luego de haber realizado las transferencias se realizó un nuevo chequeo ecográfico para reconfirmación de preñez.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó un software estadístico SPSS (versión 23) para Windows®. Para determinar la correlación entre el tiempo, dificultad y preñez se utilizaron las pruebas de: correlación de Spearman y correlación de Pearson.

Se utilizaron tablas de frecuencias para preñez a los 30-40 días así como para los 60-90 días y para la comparación entre los porcentajes de preñez en los grupos experimentales se utilizó la prueba de Chi cuadrado.

VARIABLES INDEPENDIENTES:

- Tratamiento (FM-IM; FM-IV y control).
- Tiempo (tiempo 1: hasta 45 segundos; tiempo 2: sobre los 45 segundos).
- Dificultad (dificultad 1 y dificultad 2 (2+3)).

VARIABLE DEPENDIENTE:

- Preñez (30-40 días y 60-90 días)



CAPITULO V: RESULTADOS

5.1. Relación entre las dos formas evaluadas para categorizar la dificultad de la TE

El tiempo promedio de la totalidad de las transferencias realizadas fue de 62,3 segundos, con un mínimo de 11 seg y un máximo de 357 seg y con una mediana de 44,5 seg. Los valores obtenidos con ambos sistema de evaluación fueron analizados por la correlación de Spearman (Tabla 2) y la correlación de Pearson (Tabla 3). En los tres casos se obtuvo la misma estimación de correlación y como las variables no respondieron a la distribución normal, la correlación de Spearman fue la que mejor ajustó para esta condición. Esto permitió determinar que existió una correlación positiva y significativamente alta ($P < 0,0001$) en cada uno de los tratamientos y para el total de las transferencias (0,76; 0,60; 0,74 y 0,80 para los grupos Control, FM-IV; FM-IM y total, respectivamente) entre ambos métodos de evaluación de la dificultad de la transferencia de embriones. De acuerdo con este resultado, para los análisis siguientes fue posible utilizar de forma indiferente cualquiera de las dos modalidades para caracterizar la dificultad de la maniobra.

Tabla 2.- Correlación entre tiempo y dificultad de la transferencia de embriones en vaconas (Spearman)

Tratamiento	Variable (1)	Variable (2)	n	Spearman	p-valor
Control	Tiempo	Dificultad	31	0,767	0,0001
FM-IV	Tiempo	Dificultad	40	0,601	0,0001
FM-IM	Tiempo	Dificultad	39	0,808	0,0001
Total	Tiempo	Dificultad	110	0,748	0,0001



Tabla 3.- Correlación entre tiempo y dificultad de la transferencia de embriones en vaconas (Pearson)

Tratamiento	Variable (1)	Variable (2)	n	Pearson	p-valor
Control	Tiempo	Dificultad	31	0,768	0,0001
FM-IV	Tiempo	Dificultad	40	0,755	0,0001
FM-IM	Tiempo	Dificultad	39	0,808	0,0001
Total	Tiempo	Dificultad	110	0,761	0,0001

5.2. Relación entre el grado de dificultad de la TE y la tasa de preñez a los 30-40 y 60-90 días después de la TE

A los 30-40 días (Tabla 4) cuando se realizó la primera determinación de gestación después de la TE en animales sin ningún tratamiento (grupo Control), se observó que el porcentaje de preñez total fue del 45,2% dentro de los cuales el grupo en el que la maniobra tardó ≤ 45 seg (Tiempo 1) tuvo un 50% mientras que para las transferencias embrionarias catalogadas dentro del Tiempo 2 (> 45 seg) presentaron una preñez del 42,1% ($p > 0,05$).

En la confirmación de la preñez realizada entre 60 y 90 días después de la TE, se observó que hubo algunas pérdidas embrionarias con respecto al diagnóstico realizado más temprano. Tampoco se observaron diferencias en la tasa de preñez de acuerdo al tiempo requerido para culminar la TE ($p > 0,05$) entre los tipos de dificultad registrado. La preñez para ambos tiempos (1 y 2) fue en este momento de 32,3% (Tabla 4).

Cuando se analizaron los valores de la tasa de preñez (tanto a 30-40 como a 60-90 días), en relación a la dificultad manifestada por el operador, estos fueron prácticamente idénticos a los encontrados cuando la relación de la dificultad se hizo con respecto al tiempo de la operación (Tabla 5).



Tabla 4.- Tasa de preñez y pérdidas embrionarias según el tiempo empleado en la transferencia de embriones

Tiempo (objetiva)	N° Vaconas transferidas	Preñeces 30-40 días (%)	Preñeces 60-90 días (%)	Pérdidas embrionarias (%)
Tiempo 1 (≤ 45 seg)	12	6 (50)	4 (33,3)	2/6 (33,3)
Tiempo 2 (> 45 seg)	19	8 (42,1)	6 (31,2)	2/8 (25)
Total	31	14 (45,2)	10 (32,3)	4/14 (28,6)

Tabla 5.- Tasa de preñez y pérdidas embrionarias según la dificultad manifestada por el operador en la transferencia de embriones

Dificultad (subjetiva)	N° Vaconas transferidas	Preñeces 30-40 días (%)	Preñeces 60-90 días (%)	Pérdidas embrionarias (%)
Dificultad 1	19	9 (47,4)	6 (33,3)	3/9 (33,3)
Dificultad 2 (2+3)	12	5 (41,2)	4 (33,3)	1/5 (20)
Total	31	14 (45,2)	10 (32,3)	4/14 (28,6)

Cuando el análisis se hizo a través de la correlación entre ambas variables (nivel de dificultad y tasa de gestación) (correlación de Spearman) se observó una falta de correlación entre los mismos ($p > 0,05$). En los Anexos 3 y 4 se muestran los valores las correlaciones de Spearman y Pearson.

Con estos dos estudios se pudo corroborar la primera hipótesis planteada pero se rechaza la segunda de las hipótesis.



5.3. Efecto del tratamiento con flunixin meglumine al momento de la TE sobre la tasa de preñez a los 30-40 y 60-90 días después de la TE

En la tabla 6 muestra la tasa de preñez a los 30-40 días y 60-90 días luego de la transferencia embrionaria en las vaconas receptoras, de acuerdo al tratamiento con FM. El análisis estadístico de los valores hallados para cada tratamiento mostraron que la inyección intravenosa del FM produjo una tasa de preñez a los 30-40 días después de la transferencia, significativamente ($p < 0,001$) superior (75%) a la observada en el grupo control (45%) y el grupo que recibió una inyección intramuscular de la droga (33,3%) (Tabla 6). En la reconfirmación realizada a los 60-90 días después de la transferencia, se observaron pérdidas de preñez en el grupo control (4 de 14 preñadas, 28,6%) que fueron significativamente superiores a las observadas en el grupo de FM intravenoso (2 de 30 preñadas), 6,7%; $p < 0,05$), observándose solo una pérdida en el grupo FM intramuscular.

Tabla 6.- Tasas de preñez en vaconas receptoras de embriones tratadas con FM por diferentes vías de administración al momento de la TE

Tratamiento	Número de preñeces (%)		
	30-40 días	60-90 días	Pérdidas embrionarias (%)
Control	14/31 (45,2)a	10/31 (32,3)a	4/14 (28,6)b
FM-IM	13/39 (33,3)a	12/39 (30,7)a	1/13 (7,7)c
FM-IV	30/40 (75,0)b	28/40 (70,0)b	2/30 (6,7)c

Valores con letras diferentes en cada columna difieren ^{ab} ($p < 0,001$); ^{bc} ($p < 0,005$)



5.4. Efecto del tratamiento con flunixin meglumine al momento de la TE según la duración y la dificultad subjetiva de la transferencia de embriones sobre la tasa de preñez a los 30-40 y 60-90 días después de la TE.

Al analizar el efecto del FM en función de la duración de la TE (≤ 45 seg = tiempo 1; >45 seg = tiempo 2) se observó que la aplicación intravenosa de FM mejoró de forma significativa la tasa de preñez con respecto al control y a la aplicación del FM por vía intramuscular. Esto se produjo en forma independiente al grado de dificultad observada. Por el contrario no se observaron diferencias entre el grupo control y al grupo de FM aplicado en forma intramuscular.

Cuando el mismo análisis fue realizado tomando en cuenta las observaciones de dificultad manifestadas por el operador, los resultados fueron similares a los obtenidos usando la duración de la TE corroborando la alta correlación determinada en el primer punto de estos resultados (Tabla 6).

Tabla 7.-Tasas de preñez en vacas transferidas y tratadas con FM por diferentes vías en función de la duración de la manipulación

Tratamiento	PREÑECES			
	Tiempo 1 (≤ 45 seg)		Tiempo 2 (> 45 seg)	
	30-40 días	60-90 días	30-40 días	60-90 días
Control	6/12 (50) ^a	4/12 (33,3) ^a	8/19 (42,1) ^{ab}	6/19 (31,6)
FM-IM	8/17 (47,0) ^a	8/17 (47,0) ^a	5/22 (22,7) ^a	5/21 (22,7)
FM-IV	22/27 (81,5) ^b	21/27 (77,8) ^b	9/13 (69,2) ^b	8/13 (61,5)

Valores con letras diferentes ^{ab} en la misma columna difieren ($p < 0,05$).

No se observaron diferencias en la preñez en ninguno de los momentos en que se determinó la gestación cuando se compararon los valores obtenidos en animales con dificultad 1 o 2 (2+3) en ninguno de los tratamientos. Tampoco se observaron diferencias en los valores de preñez obtenidos en ambos momentos (30-40 o 60-90 días) aun cuando hubo algunos animales que perdieron la gestación (Tabla 8).



Tabla 8.- Tasas de preñez en vaconas receptoras de embriones y tratadas con FM por diferentes vías de administración de acuerdo con la dificultad subjetiva de la manipulación

Tratamiento	PREÑECES			
	Dificultad 1		Dificultad 2 (2+3)	
	30-40 días	60-90 días	30-40 días	60-90 días
Control	9/19 (47,4) ^a	6/19 (31,6) ^a	5/12 (41,7)	4/12 (33,3)
FM-IM	7/18 (38,9) ^a	7/18 (38,9) ^a	6/21 (28,6)	6/21 (28,6)
FM-IV	27/34 (79,4) ^b	25/34 (73,5) ^b	3/6 (50,0)	3/6 (50,0)

Dificultad 1 y 2 (2+3) según lo manifestado por el operador en escala 1-3. Valores con letras diferentes ^{ab} en la misma columna difieren ($p < 0,05$).

Estos resultados permiten aceptar la tercera hipótesis planteada.



CAPITULO VI: DISCUSIÓN

La transferencia de embriones propiamente dicha y la forma en que la misma se realiza son factores que determinan la tasa de preñez lograda en un programa de superovulación y transferencia de embriones. Por ello, en este trabajo se analizaron algunos aspectos de esta maniobra y se evaluó una manera que podría contribuir a bajar el impacto negativo de la misma sobre el resultado final. Así, se determinaron dos maneras de evaluar la dificultad de la maniobra, su relación entre ellas y su relación con la tasa de preñez. En un segundo lugar, se estudió una metodología farmacológica que contribuiría a disminuir el efecto perjudicial producido cuando esta maniobra se prolonga demasiado y se manipula excesivamente el útero.

1.- Dificultad en la transferencia de embriones propiamente dicha

El primer objetivo en ésta investigación fue establecer una medida confiable de la calidad de la transferencia, y para ello se plantearon dos alternativas de medición: una subjetiva dada por la dificultad manifestada por el operador y otra objetiva determinada por la duración o tiempo transcurrido para complementar la misma.

Como primera observación se mencionó que el tiempo promedio de la totalidad de las transferencias realizadas fue de 62,3 segundos (con un min. y máx. de 11 y 357 seg, respectivamente) y una mediana de 44,5 seg. Como la distribución de estos datos no fue normal y la variabilidad fue extremadamente alta, se tomó para este estudio preferentemente el valor de la mediana (valor de la variable de posición central en un conjunto de datos), salvo cuando se especifique de otra manera. El tiempo que el operador tarda en hacer la transferencia es importante como mencionan Tervit et al. (1980), quienes determinaron que para realizar una transferencia la mediana fue de 108 seg y que la preñez tendió a ser afectada de forma lineal por la duración de la maniobra. En este estudio, solo 11 animales requirieron más de 108 seg, y en estos, se obtuvo una preñez del 27,3%, lo que fue significativamente inferior a la obtenida en el grupo con duración menor de la maniobra en el que se preñó un 48% de los animales ($p < 0,05$) (Anexos 7, 8 y 9). La duración de la maniobra en este caso fue menos de la mitad de la mencionada por Tervit et al. (1980), mostrando con seguridad, que la experticia del operador que realizó las transferencias en esta investigación fue determinante en estos resultados que coinciden con la información previa. En otro estudio realizado por Gordon (1976), se determinó que solamente cuando la maniobra tarda más de 3 minutos en ser completada existe una disminución en las tasas de preñez en las receptoras. En este estudio solo hubo 7 animales en los que la maniobra duró más de 3 minutos, y en ellos la preñez fue del 16%. De acuerdo al alto grado de experiencia del operador en este estudio, se estableció un nivel aceptable de dificultad como máximo en los 45 seg. (el valor de la mediana). Cuando se comparó la tasa de



preñez en maniobras con duración superior o inferior a esos 45 segundos, no se observaron diferencias estadísticas debidas al tiempo transcurrido en la manipulación (tabla 4). Sin embargo, se observó que las pérdidas de preñez entre los 30-40 y 60-90 días (este último fue diagnóstico de confirmación) fue superior en las receptoras en las que el tiempo de manipulación fue menor.

Según estos resultados se estableció que existe una estrecha correlación entre las dos maneras o medidas utilizadas para determinar la dificultad de la maniobra. Si bien varios autores ya habían utilizado una u otra forma para determinarla y era factible suponer su relación, en este trabajo fue posible determinar en forma precisa que esta correlación fue del 74,8 % ($p=0,0001$) indicando que cerca del 75% de la dificultad de la maniobra estuvo explicada por el tiempo que duró la misma. O dicho de otra manera, en su mayor parte, cuanto mayor sea la dificultad que experimente el operador para transferir el embrión, la duración de la misma también será mayor y esto tiene una correlación extremadamente alta.

La dificultad principal de la técnica está dada por las estructuras anatómicas del animal, en particular por el cérvix, y luego por la manipulación del útero que se realiza para tratar de colocar el embrión en el tercio anterior del cuerno ipsilateral al CL (Gordon, 1976). Estas maniobras son también responsables de la liberación de $PGF2\alpha$ como fue demostrado por diferentes autores (Ribeiro et al., 2011; Roberts, Barcikowski, Wilson, Skarnes, & McCracken, 1975; Scenna et al., 2005; Wann & Randel, 1990).

Para el desarrollo de ésta tesis se utilizaron como receptoras vaconas F1 cruce *Bos taurus* x *Bos indicus*. En un trabajo realizado por Nogueira et al. (2012), se determinó que no hubo diferencias entre receptoras de razas *Bos taurus* y *Bos indicus*. Sin embargo, es ampliamente aceptado dentro de la industria de la transferencia de embriones que las tasas de concepción son más bajas en las receptoras de tipo *Bos indicus* (puras o sus cruces) comparada con las de receptoras *Bos taurus*. Sumado a las posibles diferencias en su fertilidad innata, las hembras índicas son más difíciles de manejar, no manifiestan claramente el celo y en general es más dificultoso pasar el catéter de transferencia a través del cuello, en comparación con las hembras *taurus* (Hasler, 2012). A pesar de esto, se han realizado estudios que han demostrado que las deformaciones que presentó el cérvix en el 45% de los animales de tipo cebú, no tuvieron efecto directo en su desempeño reproductivo cuando se usó la inseminación artificial (Gómez et al., 2006). No obstante, Seidel & Seidel (1991), manifiestaron que para realizar transferencias en animales *Bos indicus* se requiere de mayor experiencia que lo habitual. En la selección de receptoras de embriones algunos autores (Duica, Tovío, & Grajales, 2007) recomiendan rechazar animales con deformidades en el cérvix, ya que esto perjudicaría el éxito de la técnica y además, mientras mayor sea la dificultad que se presente para atravesar esta estructura, mayor será la manipulación y



por lo tanto podría producirse mayor descarga de PGF2 α (Flint & Sheldrick, 1982; Wulster-Radcliffe, Wang, & Lewis, 2004). Ésta mayor o menor estimulación sobre el tracto genital estaría determinado, en buena medida, por la experiencia del operador, factor que podría influir sobre el resultado de preñez (Cutini et al., 2000).

A pesar de lo descrito en los párrafos anteriores sobre los posibles problemas que podría causar la dificultad en realizar la transferencia, en la presente investigación éste factor no tuvo influencia sobre los porcentajes de preñez observados cuando el operador manifestó o no dificultad (tabla 5). Aunque como se mencionó anteriormente, cuando los tiempos utilizados para completar la maniobra superaron los 108 segundos (según Tervit et al., 1980) o los 180 segundos (según Gordon, 1976) las tasas de preñez fueron inferiores al resto. Como las transferencias catalogadas como dificultad 3 ocurrieron en una pequeña proporción de los animales transferidos, no fue posible realizar un análisis estadístico potente. Contrario a lo observado en nuestro trabajo, Ribeiro et al. (2011) informaron de una disminución en la preñez en receptoras cuando hubo dificultad en atravesar el cérvix para realizar el depósito del embrión.

En síntesis, en este estudio, se pudo dar una magnitud a la relación existente entre dos sistemas para determinar la dificultad en la maniobra de la transferencia de embriones, se dispuso de un operador de gran experticia en la aplicación de la técnica lo que permitió llevar al mínimo las dificultades en la misma a pesar de tratarse de animales en los que frecuentemente existen problemas anatómicos para llegar al útero, y como consecuencia de esto, la posible descarga baja de PGF2 alfa producida durante la maniobra tuvo poca influencia sobre las tasas de preñez en animales con diferente duración de la maniobra salvo cuando esta fue muy larga.

2.- Alternativa farmacológica para disminuir el stress de la manipulación

Puesto que la técnica de TE exige llegar al tercio anterior del cuerno uterino para el depósito del embrión, es inevitable que se realice cierta manipulación que estimulará la descarga de PGF2 α por parte del endometrio, como ya se mencionó antes (Aké-López, 2002; Elli et al., 2001; Scenna et al., 2005). En trabajos realizados en yeguas se ha demostrado que la manipulación cervical produce aumento en las concentraciones de oxitocina pero raramente de PGF2 α (Nikolakopoulos, Kindahl, Gilbert, Goode, & Watson, 2000); en bovinos no existen evidencias que la oxitocina tenga algún efecto nocivo directo sobre el embrión, sin embargo, ésta hormona estaría involucrada en los procesos de acción de la prostaglandina a nivel uterino (Perea & Inskeep, 2008).

En estudios realizados para determinar los niveles de PGF2 α después del estímulo uterino, se ha observado en ovejas que entre los 2 y 6 minutos después del estímulo mecánico del útero los niveles de PGF2 α aumentan hasta 6 veces sus niveles en sangre (Roberts et al., 1975). Algo similar se ha observado en la vaca después de la



maniobra de transferencia de embriones (Scenna et al., 2005). En este último estudio se determinó que existe un aumento rápido de la $PGF2\alpha$, probablemente antes de los 10 minutos (esto no fue medido en este estudio pero al hacer la relación con lo observado en el ovino precedentemente se puede suponer que así ha sido también aquí) y luego hay un nuevo pico entre 2 a 6 horas del estímulo inicial. Los niveles de $PGF2\alpha$ observados en el estudio citado producto del estímulo uterino son muy similares a los observados alrededor de la luteolisis (Flint & Sheldrick, 1982). Por otra parte, hay estudios que han determinado la existencia de efectos negativos por los niveles elevados de la $PGF2\alpha$ en la sobrevida embrionaria de vacas para carne (Schrick, Inskeep, Butcher, & Virginia, 1993b) y también se ha observado que la $PGF2\alpha$ no solo actuaría a nivel del CL sino también afectarían el desarrollo del propio embrión bovino (Scenna et al., 2004). En síntesis, el efecto de la $PGF2\alpha$ podría observarse no solamente a nivel del CL (lo cual es posible relativamente ya que los animales se encontraban en una etapa temprana del ciclo) sino que también por su efecto embriotoxico (Scenna et al., 2005). En un trabajo previo de este mismo autor (Scenna et al., 2004) se determinó que el agregado de dosis muy bajas de $PGF2\alpha$ en un medio de cultivo de embriones afecta el desarrollo de los mismos e incluso impide la etapa de protrusión en el estadio de blastocisto expandido.

Con el objetivo de incrementar la eficiencia reproductiva de los bovinos se han utilizado varias estrategias antiluteolíticas incluyendo aquellas que ejercen una inhibición específica de las enzimas que participa en la síntesis de $PGF2\alpha$ como son las drogas AINES tal es el caso de la aspirina, el ibuprofeno y el flunixin meglumine (FM). Este último (FM) es una droga que ejerce un control no específico de la síntesis de prostaglandina inhibiendo en forma directa a las enzimas COX-1 y COX-2 quienes tienen la capacidad de convertir el ácido araquidónico libre, que se encuentra en grandes cantidades en el útero, en prostaglandinas (Cheng, Mckeller, & Nolan, 1998). Se han realizado una importante cantidad de estudios en los que se ha evaluado la capacidad de esta droga de mejorar la tasa de preñez después de realizar una transferencia embrionaria bajo el supuesto que podría modular el efecto de la $PGF2\alpha$ liberada después de la manipulación uterina. La mayoría de trabajos en los que se ha tratado de inhibir la liberación de prostaglandina post TE con el uso de fármacos que detienen su síntesis como es el caso del FM (el más estudiado) no han sido exitosos (Bulbul, Dursun, Kirbas, Kose, & Umutlu, 2010; Geary et al., 2010; Mcnaughtan, 2004), han presentado resultados aleatorios (Purcell et al., 2005) y en algún caso el efecto ha sido positivo aumentando la tasa de preñez después de una TE (Schrick et al., 2001, Scenna et al. 2005). En la totalidad de estos estudios, la aplicación del FM ha sido por vía intramuscular (IM) con lo cual los niveles fisiológicos de acción sobre la inhibición de la síntesis de $PGF2\alpha$ se logran aproximadamente 20 minutos después de su aplicación y, con las dosis de uso recomendadas, alcanzan aproximadamente los 2 ng/ml de sangre en ese tiempo. En un estudio evaluando diferentes vías de aplicación



del FM, se determinó que cuando es aplicada la misma dosis por vía intravenosa se alcanzan en menos de 10 minutos niveles 5 veces más altos que los logrados vía IM (Kissell et al., 2012). Si se tiene en cuenta que los niveles de PGF2 α aumentan dentro de los primeros minutos después de la estimulación uterina, es muy probable que la aplicación IM llega demasiado tarde y en niveles insuficientes como para controlar en todos los casos los niveles de PGF2 α . En el presente estudio, cuando se hizo la comparación global de los tratamientos (sin tener en cuenta el grado de dificultad determinado previamente) se observó que únicamente con la inyección IV de FM se obtuvieron valores de preñez significativamente superiores a los obtenidos con la inyección IM y con respecto al control. Entre estos dos últimos no hubo diferencias, coincidiendo con varios de los estudios señalados previamente. Con estos hallazgos se confirmó lo que se propuso en la hipótesis, de que la aplicación IV de FM podría ser realmente más efectiva que la IM para controlar la síntesis de PGF2 α inmediata después de la TE.

En la mayoría de los trabajos en que se estudió el efecto del FM, los tratamientos fueron hechos en la totalidad de los animales sin tener en cuenta el grado de dificultad que había tenido la maniobra. Si especulamos que a mayor dificultad debería haber mayor síntesis de PGF2 α , debería ser coincidente con ello que el FM debería mostrar mayor efecto en estos animales que en aquellos en que la manipulación no mostró dificultades. Sin embargo, cuando se realizó el análisis de los resultados ahora teniendo en cuenta esta dificultad, curiosamente, e inverso a lo esperado, se observó un efecto significativo del tratamiento IV particularmente en animales en los cuales la dificultad fue menor. Este resultado inesperado nos hace pensar que tal vez el solo hecho de realizar la maniobra, aún con poca dificultad, es suficiente para producir liberación de PGF2 α como para afectar la viabilidad embrionaria y los niveles rápidos y altos de FM aplicados por vía IV fueron capaces de controlarlo. Por el contrario, a mayor dificultad, probablemente los niveles de PGF2 α son significativamente más altos y tal vez más prolongados (recordar el segundo pico de PGF2 α observado entre 2 y 6 hs pos TE) con lo cual el FM inyectado por vía IV no fue suficiente para el control de la PGF2 α en estos casos.

Otro resultado inesperado es que la inyección IM de FM produjo resultados que incluso llegaron a ser inferiores a los de los animales control (sin tratamiento). Se debe recordar que las recomendaciones del laboratorio fabricante de esta droga la indican para uso IV en bovinos (Smith, Davis, Tell, Webb, & Riviere, 2008) e incluso en EEUU su uso IM está prohibido. En un estudio, en el que se evaluó el daño muscular en el sitio de inyección de varios fármacos no esteroides (FM, fenilbutazona, ketoprofeno y metamizol) se determinó que precisamente la mayor reacción inflamatoria y necrosis se observó con el FM (Pyörälä, Laurila, Lehtonen, Leppä, & Kaartinen, 1999). En el trabajo citado se ha estimado que el daño inmediato producido por la inyección IM de FM se



tradujo en la pérdida de aproximadamente 80 gr de tejido por animal. Esto debería traducirse en un significativo dolor o al menos discomfort del animal lo cual podría explicar también que un eventual efecto sobre la síntesis de PGF2 α en útero sea contrapuesto al stress causado por este tratamiento cuando es aplicado vía IM.

El FM aplicado por vía IM no fue capaz de aumentar o mantener la concentración de progesterona (Pinto et al., 2008) pero en un trabajo realizado en ovejas se demostró que puede alargar la fase lútea retrasando la luteolisis al suprimir la síntesis de PGF2 α (Aké-López et al., 2011). Sin embargo, ésta acción no ha sido suficiente para mejorar las tasas de preñez. Esto podría explicarse porque la aplicación IM de FM aunque inhibe la síntesis de PGF2 α , esto no ocurre de forma suficientemente rápida y podrían producirse niveles subluteolíticos que resultarían embriotóxicos. La toxicidad de la PGF2 α sobre el embrión mencionada antes ha sido demostrada en pruebas in vitro en bovinos (Scenna et al., 2004).

Por otra parte, se ha demostrado que los embriones poseen actividad ciclooxigenasa y son capaces de sintetizar ácido araquidónico para la producción de prostaglandinas, especialmente la PGE2 (Lewis, Thatcher, Bazer, & Curl, 1982; Racowsky & Biggers, 1983) que interviene en la formación del blastocelo, protrusión de los embriones (Scenna et al., 2004) y al mismo tiempo está involucrada en el proceso de reconocimiento materno embrionario al tener un efecto luteotrópico. Psychoyos et al. (1995), determinaron que la prostaglandina E juega un papel importante en la implantación del embrión, ya que a nivel del estroma existen puntos específicos para la unión de la progesterona dependiente de la prostaglandina E pero no para la PGF2 α .

Al ser el embrión capaz de sintetizar prostaglandinas al igual que el endometrio, el FM podría estar bloqueando el mecanismo de desarrollo del embrión (Okada et al., 2016) y ésta podría ser la causa del fracaso del FM aplicado por vía IM en los trabajos previos. El efecto positivo del FM que produce a nivel del endometrio inhibiendo la síntesis de PGF2 α estaría anulado con el efecto negativo sobre el desarrollo del embrión. Sin embargo, los resultados de este trabajo han demostrado que al evaluar otra vía de aplicación como la IV, el FM parece ser efectivo para mejorar las tasas de preñez. La explicación de este comportamiento podría estar relacionado con la vida media de la droga. Según el estudio de Navarre et al. (2001), realizado en llamas aplicando el FM por vía IV esta droga muestra que se caracteriza por tener una vida media muy corta; esto haría que el FM tenga un efecto menos prolongado que posiblemente no sería nocivo para el embrión, y gracias a su pico de acción inmediato inhibiría la síntesis de PGF2 α en el útero consiguiendo el efecto deseado. Aunque ésta parece ser la manera en la que actúa el FM por vía IV en la TE habría que realizar otros estudios que respalden estos resultados, y asimismo, determinar si el efecto es exclusivo de éste fármaco.



CAPITULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. CONCLUSIONES:

Luego de haber desarrollado este trabajo de investigación se puede concluir lo siguiente:

- De acuerdo a las pruebas estadísticas realizadas (correlación de spearman y pearson $p \leq 0,0001$) podemos concluir que existe una relación alta, positiva y significativa entre las variables objetiva (tiempo) y subjetiva (dificultad manifestada por el operador). De acuerdo con ello se concluye que mientras más tiempo transcurre desde que se inicia la maniobra de transferencia de embriones hasta su finalización, la dificultad será mayor.
- Asimismo, concluimos que no existe dependencia entre las variables preñez y dificultad, ya sea a los 30-40 días luego de la transferencia así como a los 60-90 días posteriores a la TE. Por ello podemos expresar que, cuando existe mayor dificultad al realizar la transferencia embrionaria no sería un sinónimo de menor porcentaje de preñez; así como tampoco podríamos decir que si la TE tienen menor dificultad el porcentaje de preñez sería mayor. Esto no se podría considerar como una regla general debido a que en los estudios previos se han encontrado evidencias opuestas a la nuestra. Esto puede ser debido al tamaño reducido de la muestra, pero en este experimento se pudo comprobar que la dificultad no influyó sobre la preñez en animales no tratados, salvo cuando la misma excede tiempos muy largos de maniobra.
- De acuerdo al test de chi cuadrado podemos concluir que la aplicación del antiprostaglandínico FM a una dosis de 2,2 mg/kg de peso vivo por vía intravenosa inmediatamente después de haber realizado la TE, produjo un efecto positivo sobre el porcentaje de preñez. Al diagnóstico realizado a los 30-40 días post TE se observó un 45% de preñez en las vaconas testigo, un 33,33% de preñez en las vaconas a las que se les aplicó el FM por vía IM y un 75% de preñez en las vaconas con el tratamiento de FM por vía intravenosa. De igual manera, a la reconfirmación de la preñez a los 60-90 días post TE se observó un 32,26% de preñez en las vaconas testigo, un 33,33% de preñez en las vaconas a las que se les aplicó el FM por vía IM y un 70% de preñez en las vaconas con el tratamiento de FM por vía intravenosa.



- Mediante la prueba de chi cuadrado ($p=0.00030$) fue posible concluir que la aplicación del FM a una dosis de 2,2mg/kg por vía intravenosa fue particularmente importante para aumentar el porcentaje de preñez cuando la duración de la transferencia fue ≤ 45 segundos.
- De acuerdo los resultados obtenidos podemos concluir que al aplicar FM por vía intramuscular luego de realizada la transferencia de los embriones a una dosis de 2,2 mg/kg de peso vivo no aumentó el porcentaje de preñez con respecto al grupo no tratado.

7.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que las transferencias de embriones que se realicen en vaconas, tengan una duración de menos de 45 segundos, ya que así estaremos obteniendo un mayor porcentaje de preñez.
- Aplica FM por vía intravenosa a una dosis de 2,2 mg/kg de peso vivo inmediatamente posterior a la TE, con esto se lograría aumentar significativamente el porcentaje de preñez.
- Habría que realizar nuevas investigaciones pero con un grupo experimental más alto para poder reconfirmar los resultados obtenidos.
- Sería importante realizar un nuevo experimento en el que se realicen análisis en sangre de las concentraciones de progesterona que presenta cada una de las receptoras para poder conocer si este es un factor determinante en la obtención de los resultados.
- Se podría realizar análisis en sangre para determinar la concentración de $PGF2\alpha$ que se encuentran en las receptoras luego de realizada la TE así como también se podría medir la concentración de la misma cada 10 minutos en grupos en los que se aplicó el tratamiento del FM por vía IV así como en los grupos testigo.

**BIBLIOGRAFÍA:**

- Aké López, J. (2002). Efecto del flunixin meglumine en el porcentaje de gestación de ovejas receptoras de embriones. *Rev Biomed*, 13(2), 100–108. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2002/bio022d.pdf>
- Aké López, J., Herrera-Camacho, J., Quintal-Franco, J. A., & Segura-Correa, J. C. (2011). Efecto del flunixin meglumine en la duración del ciclo estral y fase lútea de ovejas Pelibuey. *Universidad y Ciencia*, 27(2), 233-238.
- Alberio, R. H. (1993). Manejo de donantes y receptoras. In G. Palma & G. Brem (Eds.), *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina* (pp. 9–12). Munich: Reprobio.
- Arriaga, J. (2010). *Transferencia de Embriones en Bovinos. Revisión*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Barros, C., & Nogueira, M. F. (2001). Embryo transfer in cattle. *Theriogenology*, 56(9), 1483–1496. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00648-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00648-3)
- Baruselli, P. S., De Sá Filho, M. F., Martins, C. M., Nasser, L. F., Nogueira, M. F. G., Barros, C. M., & Bó, G. A. (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65(1), 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.006>
- Belo, D. C. de S., & Andrade Pinto, S. (2013). Influência do uso de anti-inflamatórios não esteroidais na taxa de gestação de éguas receptoras. Retrieved from <http://icbs.pucminas.br/arq/Destaques/pdf/INFLUÊNCIA DO USO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS.pdf>
- Bo, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., & Mapletoft, R. J. (1996). Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 45(5), 897–910. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00020-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00020-9)
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., & Mapletoft, R. J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 53–72. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00657-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00657-4)
- Bó, G. A., Moreno, D., Cutaia, L., & M, C. (2004). Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus*, 4(21), 25-45. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Gabriel_Bo/publication/228448348_Transferencia_de_embryones_a_tiempo_fijo_tratamientos_y_factores_que_afectan_los_indices_de_preñez/links/02e7e52028f3a67a6e000000.pdf



- Boland, M. P., Goulding, D., & Roche, J. F. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35(1), 5–17.
- Buford, W. I., Ahmad, N., Schrick, F. N., Butcher, R. L., Lewis, P. E., & Inskip, E. K. (1996). Embryotoxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. *Biology of Reproduction*, 54(3), 531–7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.3.531>
- Bulbul, B., Dursun, S., Kirbas, M., Kose, M., & Umutlu, S. (2010). The Effect of Flunixin Meglumine Injected Before Embryo Transfer on Pregnancy Rates in Heifers. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 105–109. Retrieved from <http://vetdergi.kafkas.edu.tr>
- Callejas, S., Cabodevila, J., Palma, G., Alberio, R. H., Torquati, S., Butler, Teruel, H., Aller, J., Hozbor, F., Mucci, N., Kaiser, G., Sanchez, E., Manes, Jorgelina, H., & Ríos, G. (2008). Evaluación de los Embriones Bovinos. In *Memorias del curso de superovulacion y transferencia de embriones bovinos*. Mar del Plata: INTA Balcarce.
- Cardoso, R. D. C. (2009). *Botucatu – sp Junho/2016*. Universidad estadual Paulista. Retrieved from http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98177/cardoso_rc_me_botfmvz.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cheng, Z., Mckeller, Q., & Nolan, A. (1998). Pharmacokinetic studies of flunixin meglumine and phenylbutazone in plasma, exudate and transudate in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 21(4), 315–321. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1998.00144.x>
- Cutini, A., Teruel, M., & Cabodevila, J. (2000). Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirurgica de embriones bovinos. *Taurus*, 7, 28–39.
- Donalson, L. E. (1984). Embryo production in superovulated cows: transferable embryos correlated with total embryos. *Theriogenology*, 21(4), 517–524.
- Duica, A., Tovío, N., & Grajales, H. (2007). Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, (14), 107–124. Retrieved from <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/1805%5Cnhttp://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/viewFile/1805/1673>
- Echeverría, J. (2006). Endocrinología Reproductiva: Prostaglandina F2 α en vacas. Revisión bibliográfica. *Redvet*, 7(1).
- Elli, M., Gaffuri, B., Frigerio, A., Zanardelli, M., Covini, D., Candiani, M., & Vignali, M. (2001). Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction*, 121(1), 151–154. <https://doi.org/10.1530/reprod/121.1.151>



- Elsden, R. P., Hasler, J. F., & Seidel, G. E. (1976). Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, 6(5), 523–532. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(76\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(76)90120-5)
- Elsden, R. P., Nelson, L. D., & Seidel, G. E. (1978). Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, 9(1), 17–26.
- Farias, M. C., Junior, Junior, A. R. de P., Amorim, R. M. D. R., Lima, E. B. de, Neto, H. F. V., & Bartolomeu, C. C. (2013). Efeito Do Flunixin Meglumine Sobre a Taxa De Prenhez Em Receptoras Bovinas De Embriões Produzidos in vitro, 3–5. Retrieved from <http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R0109-1.pdf>
- Flint, A. P. F., & Sheldrick, E. L. (1982). Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. *Nature*, 297(5867), 587–588. <https://doi.org/10.1038/297587a0>
- Garrote, M., & Scardaccione, L. (2010). *Martín Garrote*. Universidad Nacional de Córdoba. Retrieved from <http://iracbiogen.com.ar/admin/biblioteca/documentos/Tesis%20Especialidad%20Garrote%20%20Scardaccione.pdf>
- Geary, T. W., Ansotegui, R. P., MacNeil, M. D., Roberts, A. J., & Waterman, R. C. (2010). Effects of flunixin meglumine on pregnancy establishment in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 88(3), 943–949. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2087>
- Gómez, L. O. A., Galindo, A. R., Palmero, A. G., Silveira, E. A., Departamento, P., Centro, A., & Sancti, U. De. (2006). Tamaño y forma de los ovarios y del cérvix de hembras cebu de Cuba y sus relaciones con la eficiencia reproductiva (Size and shape of the ovaries and cervix of female zebu from cuba and their relationship with the reproductive efficiency). *REDVET*, 7(3). Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030306.html#030604>
- Gordon, I. (1976). Cattle twinning by the egg transfer approach the bred cow as the recipient in egg transfer in cattle. In F. L.E.A. Rowson, obe, frcvs (Ed.), *Seminar on egg transfer in cattle in the EEC programme of co-ordination of research on beef production* (p. 305).
- Hasler, J. F. (2012). Bovine embryo transfer: are efficiencies improving?. In *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. Retrieved from http://appliedreprostrategies.com/pdfs/2012ARSBC_25HaslerProceedings.pdf
- Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., Shuey, L.S., Stokes, S. A., & Trimmer, S. A. (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43(1), 141–152. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00020-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00020-U)
- Heape, W. (1890). Further note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proceedings of the Royal Society*, 62, 178–180.



<https://doi.org/10.1098/rspl.1897.0093>

- Hockett, M. E., Rohrbach, N. R., & Schrick, F. N. (2004). Alterations in embryo development in progesterone-supplemented cows administered prostaglandin F2a. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 73(3–4), 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.02.002>
- Jiménez, C. (2009). Superovulación : estrategias , factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en Bovinos Superovulation: strategies , associated factors , and prediction of superovulatory reponse in cows. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia (Universidad Nacional de Colombia)*, 56(3), 195–214.
- Kim, S.-S., Bang, J.-I., Fakruzzaman, M., Lee, K.-L., Ko, D.-H., Ghanem, N., Wang, Z., Kong, I.-K. (2014). Effects of flunixin meglumine and prostaglandin F2a treatments on the development and quality of bovine embryos in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 957–963. <https://doi.org/10.1111/rda.12413>
- Kissell, L. W., Smith, G. W., Leavens, T. L., Baynes, R. E., Wu, H., & Riviere, J. E. (2012). Plasma pharmacokinetics and milk residues of flunixin and 5-hydroxy flunixin following different routes of administration in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 7151–7157. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5754>
- Lewis, G. S., Thatcher, W. W., Bazer, F. W., & Curl, J. S. (1982). Metabolism of Arachidonic Acid In Vitro by Bovine Blastocysts and Endometrium. *Biology of Reproduction*, 27(43), 1–439. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.2.431>
- Lindner, G. M., & Wright, R. W. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), 407–416. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90201-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90201-7)
- Ling, Z. J., Shi, D. S., Huang, H. M., Wei, Y. M., Jiang, R. M., & Lu, K. H. (1995). Pregnancy rate following transfer of ivf bovine embryos at different developmental stages. *Theriogenology*, 1(43), 266. Retrieved from <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-736b392b-7055-3892-a9ae-f63c042b6881>
- Mapletoft, R. J., Bennett Steward, K., & Adams, G. P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 42(6), 601–611. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002046>
- Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2011). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 278–283.
- Martínez, A. G. (2006). *Embriones bovinos y ovinos*. Universidad de Buenos Aires. Retrieved from http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3986_Martinez.pdf
- Mcnaughtan, J. W. (2004). *The effect of prostaglandin inhibitor on pregnancy rates of*



heifer embryo transfer recipients. Brigham Young University.

- Merrill, M. L., Ansotegui, R. P., Burns, P. D., MacNeil, M. D., & Geary, T. W. (2007). Effects of flunixin meglumine and transportation on establishment of pregnancy in beef cows. *Journal of Animal Science*, 85(6), 1547–1554. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-587>
- Moon, H. S., Park, S. H., Lee, J. O., Kim, K. S., & Joo, B. S. (2004). Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 82(4), 816–820. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.140>
- Nasser, L. F., Reis, E. L., Oliveira, M. A., Bó, G. A., & Baruselli, P. S. (2004). Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* × *Bos taurus* recipients. *Theriogenology*, 62(9), 1577–1584. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.013>
- Navarre, C. B., Ravis, W. R., Nagilla, R., Deshmukh, D., Simpkins, A., Duran, S. H., & Pugh, D. G. (2001). Pharmacokinetics of flunixin meglumine in llamas following a single intravenous dose. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24(5), 361–364. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2001.00356.x>
- Nikolakopoulos, E., Kindahl, H., Gilbert, C. L., Goode, J., & Watson, E. D. (2000). Release of oxytocin and prostaglandin F2a around teasing, natural service and associated events in the mare. *Animal Reproduction Science*, 63(1–2), 89–99. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00149-4)
- Nogueira, É., Cardoso, G. S., Junior, H. R. M., Dias, A. M., Ítavo, L. C. V., & Borges, J. C. (2012). Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(9), 2129–2133. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000900022>
- Okada, C., Segabinazzi, L., & Alvarenga, M. A. (2016). Application of flunixin meglumine at the time of embryo transfer and the effect on the fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41(2016), 60. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.037>
- Palma, G. A. (2008). *Biología de la Reproducción*. (Reprobiotec, Ed.) (Segunda ed). Mar del Plata.
- Perea, F. G., & Inskeep, E. K. (2008). Infertility associated with the duration of luteal phase in postpartum cows. Infertilidad asociada con la duración de la fase luteal en vacas postparto. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 16(3), 187–198.
- Pérez, A., Cartaya, L., Valencia, V., Sanjurjo, V., & Illasástigui, T. (1998). Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Rev Cubana Estomatología*, 35(2), 56–61. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/est/v35n2/est04298.pdf>



- Perez García, L. R. (2001). *Perez 2001. FM y P4 en el aumento del porcentaje de preñeces*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/4921/1/1020145983.PDF>
- Pinto, A., Mendes de Lucca, F., Alberton, J., Falci Mota, M., Lucacin, E., Maia, A., Acco, A., Ferreira da Fonseca, J., Monteiro da Silva, J., Vieira da Silva, A., & Zandonardi, F. (2008). Avaliação dos efeitos do flunixin meglumine sobre a concentração sérica de progesterona e ciclo estral em novilhas e vacas mestiças. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 15(1), 10–14. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.198>
- Psychoyos, A., Nikas, G., & Gravanis, A. (1995). The role of prostaglandins in blastocyst implantation. *Human Reproduction*, 10(2), 30–42. https://doi.org/10.1093/humrep/10.suppl_2.30
- Purcell, S. H., Beal, W. E., & Gray, K. R. (2005). Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. *Theriogenology*, 64(4), 867–878. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.12.015>
- Pyörälä, S., Laurila, T., Lehtonen, S., Leppä, S., & Kaartinen, L. (1999). Local tissue damage in cows after intramuscular administration of preparations containing phenylbutazone, flunixin, ketoprofen and metamizole. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 40(January 2016), 145–150.
- Racowsky, C., & Biggers, J. D. (1983). Are blastocyst prostaglandins produced endogenously?. *Biology of Reproduction*, 29(2), 379–388. <https://doi.org/10.1095/biolreprod29.2.379>
- Resende, Á. M. D. E. (2009). Efeito do tratamento anti- inflamatório na histologia endometrial , produção de prostaglandina e taxa de gestação após transferência de embriões e / ou manipulação cervical em éguas.
- Ribeiro, A. de L., Freitas, D. S., Rodrigues, A. S., Chalhoub, M., Ferraz, P. A., Loiola, M., & Andrade, B. (2011). Uso de um inibidor da síntese de prostaglandinas em receptoras bovinas com ou sem dificuldade de transposição cervical. *Rev. Bras. Saúde Prod. An*, 12(3), 819–827.
- Roberts, J. S., Barcikowski, B., Wilson, L., Skarnes, R. C., & McCracken, J. A. (1975). Hormonal and related factors affecting the release of prostaglandin F2 α from the uterus. *Journal of Steroid Biochemistry*, 6(6), 1091–1097. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(75\)90354-4](https://doi.org/10.1016/0022-4731(75)90354-4)
- Rossetti, R. C., Perdigão, A., Mesquita, F. S., Sá Filho, M., Nogueira, G. P., Machado, R., Membrive, C.M.B., & Binelli, M. (2011). Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows. *Theriogenology*, 76(4), 751–758. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.008>



- Rubinstein, M., Marazzi, a, & Polak de Fried, E. (1999). Low-dose aspirin treatment improves ovarian responsiveness, uterine and ovarian blood flow velocity, implantation, and pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization: a prospective, randomized, double-blind placebo-controlled assay. *Fertility and Sterility*, 71(5), 825–829. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00088-6)
- Sartori, R., & Nunes, A. (1995). Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e Clonagem.3° Simposio Internacional de Reproducao Animal Aplicada, 175–194. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Margot_Dode/publication/228478677_Mortalidade_embrionaria_na_IA_TE_FIV_e_clonagem/links/0f3175350f9473499e000000.pdf
- Scenna, F. ., Edwards, J. ., Rohrbach, N. ., Hockett, M. ., Saxton, A. ., & Schrick, F. . (2004). Detrimental effects of prostaglandin F2 α on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 73(3–4), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.02.001>
- Scenna, F. N., Hockett, M. E., Towns, T. M., Saxton, A. M., Rohrbach, N. R., Wehrman, M. E., & Schrick, F. N. (2005). Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 78(1–4), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2005.02.003>
- Scenna, F. N., Edwards, J. L., Schuenemann, G. M., & D. A. Roper, N. S. (2007). Pregnancy rates of recipient animals following application of a selective prostaglandin F2a receptor antagonist during embryo recovery. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 154-154. Retrieved from <http://www.publish.csiro.au/rd/RDv20n1Ab147>
- Schrick, F., Hockett, M. E., Towns, T. M., Saxton, A. M., Wert, N. E., & Wehrman, M. E. (2001). Administration of a prostaglandin inhibitor immediately prior to embryo transfer improves pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 55(1), 370.
- Schrick, F. N., Inskeep, E. K., Butcher, R. O. Y. L., & Virginia, W. (1993a). Pregnancy Rates for Embryos Transferred from Early Postpartum Beef Cows into Recipients with Normal Estrous Cycles. *Biology of Reproduction*, 49(3), 617–621. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Keith_Inskeep/publication/14799166_Pregnancy_rates_for_embryos_transferred_from_early_postpartum_beef_cows_into_recipients_with_normal_estrous_cycles/links/0c96053506388ab868000000.pdf
- Schrick, F. N., Inskeep, E. K., Butcher, R. O. Y. L., & Virginia, W. (1993b). Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. *Biology of reproduction*. 49(3), 617–621.
- Seidel, E., & Seidel, S. M. (1991). *Training manual for embryo transfer in cattle*.
- Selk, G. (1991). *Embryo Transfer in Cattle*.



- Smith, G. W., Davis, J. L., Tell, L. A., Webb, A. I., & Riviere, J. E. (2008). Extralabel use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(5), 697–701. <https://doi.org/10.2460/javma.232.5.697>
- Soares, A. T., Simplício, A. A., Andrioli-Pinheiro, A., Salles, H. O., & Moura Sobrinho, P. A.; Azevedo, H. C. (1998). *FM sobre regresion prematura del CL en cabras*. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=pt&nextAction=lnk&exprSearch=265566&indexSearch=ID>
- Stringfellow, D. A., & Seidel, S. M. (2000). Certificación e Identificación de los embriones. In *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones* (3ra ed., pp. 109–142). Illinois.
- Tervit, H. R., Cooper, M. W., Goold, P. G., & Haszard, G. M. (1980). Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology*, 13(1), 63–71. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(80\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(80)90015-1)
- Velez, J. S., Randel, R. D., & Neuendorff, D. A. (1991). Effect of uterine manipulation on postpartum fertility and plasma 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2a in Brahman cows and first-calf heifers. *Theriogenology*, 36(6), 987–998. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90323-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90323-6)
- Wann, R. A., & Randel, R. D. (1990). Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin F2 alpha in multiparous and primiparous Brahman cows. *Journal of Animal Science*, 68(5), 1389–1394.
- Wright, J. M. (1981). Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*, 15(1), 43–56. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(81\)80017-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(81)80017-9)
- Wulster-Radcliffe, M. C., Wang, S., & Lewis, G. S. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*, 62(6), 990–1002. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.031>



ANEXOS

Anexo 1.- Chi cuadrado para la tasa preñez a los 30 – 40 días y el grado de dificultad

Resultado de la preñez 30-40		Grado de dificultad		Total
		1,0	2,0	
,0	Recuento	9 _a	7 _a	16
	% dentro de 1	50,0%	58,3%	53,3%
1,0	Recuento	9 _a	5 _a	14
	% dentro de 1	50,0%	41,7%	46,7%
Total	Recuento	18	12	30
	% dentro de 1	100,0%	100,0%	100,0%



Cada letra del subíndice denota un subconjunto de 1 categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel 0,05, ni en X^2 ni con F-Fisher.

Anexo 2.- Chi cuadrado para la tasa preñez a los 60 – 90 días y el grado de dificultad

Resultado de la preñez 60-90		Grado de dificultad		Total
		1,0	2,0	
,0	Recuento	12 _a	8 _a	20
	% dentro de 1	66,7%	66,7%	66,7%
1,0	Recuento	6 _a	4 _a	10
	% dentro de 1	33,3%	33,3%	33,3%
Total	Recuento	18	12	30
	% dentro de 1	100,0%	100,0%	100,0%



Cada letra del subíndice denota un subconjunto de 1 categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel 0,05, ni en X^2 ni con F-Fisher.

Anexo 3.- Correlaciones de Pearson para los grupos Control, FM-IV y FM-IM

Grupo Control		Tiempo	Dificultad	Preñez30-40	Preñez60-90
Tiempo	Correlación de Pearson	1	,705**	,088	,041
	Sig. (bilateral)		,000	,637	,826
	N	31	31	31	31
Dificultad	Correlación de Pearson	,705**	1	,034	-,054
	Sig. (bilateral)	,000		,856	,771
	N	31	31	31	31
Preñez 30-40	Correlación de Pearson	,088	,034	1	,760**
	Sig. (bilateral)	,637	,856		,000
	N	31	31	31	31
Preñez 60-90	Correlación de Pearson	,041	-,054	,760**	1
	Sig. (bilateral)	,826	,771	,000	
	N	31	31	31	31

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Grupo FM-IV		Tiempo	Dificultad	Preñez 30-40	Preñez 60-90
Tiempo	Correlación de Pearson	1	,768**	,100	,082
	Sig. (bilateral)		,000	,539	,616
	N	40	40	40	40
Dificultad	Correlación de Pearson	,768**	1	,113	,064
	Sig. (bilateral)	,000		,487	,694



	N	40	40	40	40
Preñez 30-40	Correlación de Pearson	,100	,113	1	,882**
	Sig. (bilateral)	,539	,487		,000
	N	40	40	40	40
Preñez 60-90	Correlación de Pearson	,082	,064	,882**	1
	Sig. (bilateral)	,616	,694	,000	
	N	40	40	40	40

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Grupo FM-IM		Tiempo	Dificultad	Preñez 30-40	Preñez 60-90
Tiempo	Correlación de Pearson	1	,755**	,240	,240
	Sig. (bilateral)		,000	,142	,142
	N	39	39	39	39
Dificultad	Correlación de Pearson	,755**	1	,257	,257
	Sig. (bilateral)	,000		,114	,114
	N	39	39	39	39
Preñez 30-40	Correlación de Pearson	,240	,257	1	1,000**
	Sig. (bilateral)	,142	,114		,000
	N	39	39	39	39
Preñez 60-90	Correlación de Pearson	,240	,257	1,000**	1
	Sig. (bilateral)	,142	,114	,000	
	N	39	39	39	39

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).



Anexo 4.- Correlaciones de Spearman para los grupos Control, FM-IV y FM-IM

Grupo Control			Tiempo	Dificultad	Preñez 30-40	Preñez 60-90
Rho de Spearman	Tiempo	Coefficiente de correlación	1,000	,767**	-,033	-,050
		Sig. (bilateral)	.	,000	,862	,789
		N	31	31	31	31
Dificultad	Dificultad	Coefficiente de correlación	,767**	1,000	,046	-,036
		Sig. (bilateral)	,000	.	,804	,848
		N	31	31	31	31
Preñez 30-40	Preñez 30-40	Coefficiente de correlación	-,033	,046	1,000	,760**
		Sig. (bilateral)	,862	,804	.	,000
		N	31	31	31	31
Preñez 60-90	Preñez 60-90	Coefficiente de correlación	-,050	-,036	,760**	1,000
		Sig. (bilateral)	,789	,848	,000	.
		N	31	31	31	31

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Grupo FM-IV			Tiempo	Dificultad	Preñez 30-40	Preñez 60-90
Rho de Spearman	Tiempo	Coefficiente de correlación	1,000	,601**	,175	,185
		Sig. (bilateral)	.	,000	,279	,254
		N	40	40	40	40



Dificultad	Coeficiente de correlación	,601**	1,000	,218	,160
	Sig. (bilateral)	,000	.	,177	,324
	N	40	40	40	40
Preñez 30-40	Coeficiente de correlación	,175	,218	1,000	,882**
	Sig. (bilateral)	,279	,177	.	,000
	N	40	40	40	40
Preñez 60-90	Coeficiente de correlación	,185	,160	,882**	1,000
	Sig. (bilateral)	,254	,324	,000	.
	N	40	40	40	40

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Grupo FM-IM			Tiempo	Dificultad	Preñez 30-40	Preñez 60-90
Rho de Spearman	Tiempo	Coeficiente de correlación	1,000	,808**	,210	,210
		Sig. (bilateral)	.	,000	,199	,199
		N	39	39	39	39
Dificultad	Coeficiente de correlación	Coeficiente de correlación	,808**	1,000	,227	,227
		Sig. (bilateral)	,000	.	,164	,164
		N	39	39	39	39
Preñez 30-40	Coeficiente de correlación	Coeficiente de correlación	,210	,227	1,000	1,000**
		Sig. (bilateral)	,199	,164	.	.
		N	39	39	39	39
Preñez 60-90	Coeficiente de correlación	Coeficiente de correlación	,210	,227	1,000**	1,000
		Sig. (bilateral)	,199	,164	.	.
		N	39	39	39	39

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).



Anexo 5.- Chi cuadrado para la tasa preñez a los 30 – 40 días y grupos de tratamiento

			GRUPOS			Total
			FM-IV	FM-IM	Control	
PREÑEZ 30-40	PREÑADA	Recuento	30 _a	13 _b	14 _b	57
		% dentro de TRATAMIENTO	75,0%	33,3%	45,2%	51,8%
	NO PREÑADA	Recuento	10 _a	26 _b	17 _b	53
		% dentro de TRATAMIENTO	25,0%	66,7%	54,8%	48,2%
Total		Recuento	40	39	31	110



% dentro de TRATAMIENTO	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
----------------------------	--------	--------	--------	--------

Cada letra del subíndice denota un subconjunto de GRUPOS categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel 0,05.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	GI	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	14,497 ^a	2	,001
Razón de verosimilitud	15,028	2	,001
Asociación lineal por lineal	7,259	1	,007
N de casos válidos	110		

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 14,94.

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado o asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Intervalo por intervalo	R de Pearson	,258	,091	2,776	,006 ^c
Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	,267	,092	2,880	,005 ^c
N de casos válidos		110			



- a. No se presupone la hipótesis nula.
- b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.
- c. Se basa en aproximación normal.

Anexo 6.- Chi cuadrado para la tasa preñez a los 60 – 90 días y grupos de tratamiento

			GRUPOS			Total
			FM-IV	FM-IM	Control	
PREÑEZ 60-90	PREÑADA	Recuento	28 _a	13 _b	10 _b	51
		% dentro de TRATAMIENTO	70,0%	33,3%	32,3%	46,4%
	NO PREÑADA	Recuento	12 _a	26 _b	21 _b	59
		% dentro de TRATAMIENTO	30,0%	66,7%	67,7%	53,6%
Total		Recuento	40	39	31	110
		% dentro de TRATAMIENTO	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



Cada letra del subíndice denota un subconjunto de GRUPOS categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel 0,05.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	Gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	14,129 ^a	2	,001
Razón de verosimilitud	14,407	2	,001
Asociación lineal por lineal	10,843	1	,001
N de casos válidos	110		

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 14,37.

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Intervalo por intervalo	R de Pearson	,315	,089	3,454	,001 ^c
Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	,321	,090	3,526	,001 ^c
N de casos válidos		110			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

c. Se basa en aproximación normal.

Anexo 7.- Detalle de las transferencias realizadas y el diagnostico de preñez en el Grupo FM-IV

# DE VACA	VÍA	TIEMPO	DIFICULTAD	PREÑEZ 30-40d	CONFIRMACIÓN 60-90d
1	IV	28,00	1	PREÑADA	PREÑADA
2	IV	23,00	1	PREÑADA	PREÑADA
3	IV	52,00	1	PREÑADA	VACÍA
4	IV	25,00	1	PREÑADA	PREÑADA
5	IV	35,00	1	PREÑADA	PREÑADA
6	IV	45,00	1	PREÑADA	PREÑADA
7	IV	252,00	3	PREÑADA	PREÑADA
8	IV	15,00	1	PREÑADA	PREÑADA
9	IV	40,00	1	PREÑADA	PREÑADA
10	IV	90,00	2	VACÍA	VACÍA
11	IV	60,00	1	VACÍA	VACÍA
12	IV	24,00	1	VACÍA	VACÍA
13	IV	30,00	1	PREÑADA	PREÑADA
14	IV	75,00	2	VACÍA	VACÍA
15	IV	21,00	1	VACÍA	VACÍA
16	IV	30,00	1	PREÑADA	PREÑADA
17	IV	50,00	1	VACÍA	VACÍA
18	IV	40,00	1	PREÑADA	PREÑADA
19	IV	16,00	1	PREÑADA	PREÑADA
20	IV	25,00	1	VACÍA	VACÍA
21	IV	53,00	2	PREÑADA	PREÑADA
22	IV	11,00	1	PREÑADA	PREÑADA
23	IV	30,00	1	PREÑADA	PREÑADA
24	IV	22,00	1	PREÑADA	PREÑADA
25	IV	38,00	1	PREÑADA	PREÑADA
26	IV	34,00	1	PREÑADA	PREÑADA
27	IV	30,00	1	PREÑADA	VACÍA
28	IV	51,00	1	PREÑADA	PREÑADA
29	IV	17,00	1	PREÑADA	PREÑADA
30	IV	57,00	1	PREÑADA	PREÑADA
31	IV	36,00	1	PREÑADA	PREÑADA
32	IV	51,00	1	PREÑADA	PREÑADA
33	IV	32,00	1	VACÍA	VACÍA
34	IV	56,00	1	PREÑADA	PREÑADA
35	IV	42,00	1	PREÑADA	PREÑADA
36	IV	40,00	1	VACÍA	VACÍA
37	IV	70,00	3	PREÑADA	PREÑADA
38	IV	105,00	2	VACÍA	VACÍA
39	IV	40,00	1	PREÑADA	PREÑADA
40	IV	30,00	1	PREÑADA	PREÑADA

Anexo 8.- Detalle de las transferencias realizadas y el diagnostico de preñez en el Grupo FM-IM

# DE VACA	VÍA	TIEMPO	DIFICULTAD	PREÑEZ 30-40d	CONFIRMACIÓN 60-90d
41	IM	33,00	1	PREÑADA	PREÑADA
42	IM	26,00	1	PREÑADA	PREÑADA
43	IM	75,00	2	PREÑADA	PREÑADA
44	IM	103,00	2	PREÑADA	PREÑADA
45	IM	120,00	2	PREÑADA	PREÑADA
46	IM	66,00	2	PREÑADA	PREÑADA
47	IM	115,00	2	PREÑADA	PREÑADA
48	IM	40,00	1	PREÑADA	PREÑADA
49	IM	42,00	2	PREÑADA	PREÑADA
50	IM	22,00	1	PREÑADA	PREÑADA
51	IM	32,00	1	PREÑADA	PREÑADA
52	IM	32,00	1	PREÑADA	PREÑADA
53	IM	25,00	1	PREÑADA	PREÑADA
54	IM	72,00	2	VACÍA	VACÍA
55	IM	39,00	2	VACÍA	VACÍA
56	IM	70,00	1	VACÍA	VACÍA
57	IM	208,00	3	VACÍA	VACÍA
58	IM	49,00	2	VACÍA	VACÍA
59	IM	135,00	3	VACÍA	VACÍA
60	IM	270,00	3	VACÍA	VACÍA
61	IM	210,00	3	VACÍA	VACÍA
62	IM	212,00	3	VACÍA	VACÍA
63	IM	60,00	1	VACÍA	VACÍA
64	IM	357,00	3	VACÍA	VACÍA
65	IM	14,00	1	VACÍA	VACÍA
66	IM	33,00	1	VACÍA	VACÍA
67	IM	27,00	1	VACÍA	VACÍA
68	IM	108,00	2	VACÍA	VACÍA
69	IM	88,00	2	VACÍA	VACÍA
70	IM	60,00	1	VACÍA	VACÍA
71	IM	39,00	1	VACÍA	VACÍA
72	IM	57,00	1	VACÍA	VACÍA
73	IM	65,00	3	VACÍA	VACÍA
74	IM	74,00	2	VACÍA	VACÍA
75	IM	33,00	2	VACÍA	VACÍA
76	IM	40,00	1	VACÍA	VACÍA
77	IM	12,00	1	VACÍA	VACÍA
78	IM	32,00	1	VACÍA	VACÍA
79	IM	82,00	3	VACÍA	VACÍA

Anexo 9.- Detalle de las transferencias realizadas y el diagnostico de preñez en el Grupo Control

# DE VACA	VÍA	TIEMPO	DIFICULTAD	PREÑEZ 30-40d	CONFIRMACIÓN 60-90d
80	T	17,00	1	VACÍA	VACÍA
81	T	13,00	1	VACÍA	VACÍA
82	T	85,00	1	VACÍA	VACÍA
83	T	44,00	1	PREÑADA	PREÑADA
84	T	40,00	1	VACÍA	VACÍA
85	T	40,00	1	PREÑADA	VACÍA
86	T	48,00	1	VACÍA	VACÍA
87	T	57,00	1	PREÑADA	VACÍA
88	T	34,00	1	VACÍA	VACÍA
89	T	41,00	1	PREÑADA	VACÍA
90	T	50,00	1	VACÍA	VACÍA
91	T	44,00	1	PREÑADA	PREÑADA
92	T	54,00	1	PREÑADA	PREÑADA
93	T	38,00	1	PREÑADA	PREÑADA
94	T	26,00	1	PREÑADA	PREÑADA
95	T	32,00	1	VACÍA	VACÍA
96	T	57,00	1	VACÍA	VACÍA
97	T	24,00	1	VACÍA	VACÍA
98	T	55,00	1	PREÑADA	PREÑADA
99	T	59,00	2	VACÍA	VACÍA
100	T	79,00	2	VACÍA	VACÍA
101	T	65,00	2	VACÍA	VACÍA
102	T	80,00	2	PREÑADA	PREÑADA
103	T	60,00	2	VACÍA	VACÍA
104	T	80,00	2	PREÑADA	PREÑADA
105	T	56,00	2	PREÑADA	PREÑADA
106	T	55,00	2	VACÍA	VACÍA
107	T	88,00	2	VACÍA	VACÍA
108	T	68,00	2	PREÑADA	VACÍA
109	T	272,00	3	VACÍA	VACÍA
110	T	96,00	3	PREÑADA	PREÑADA

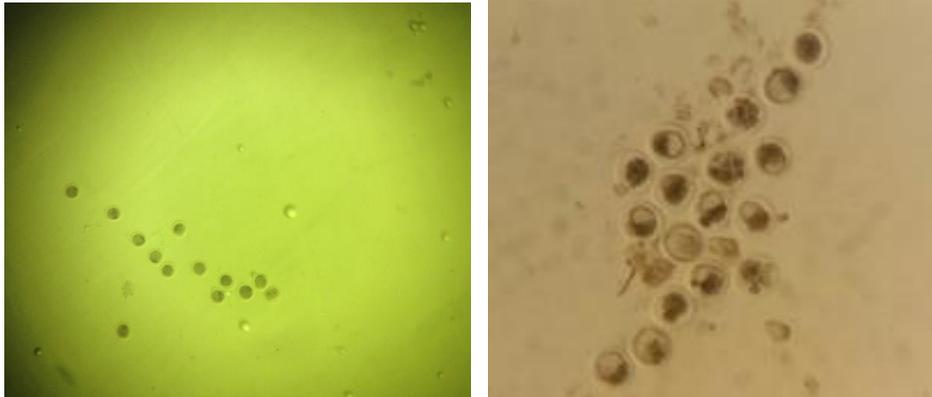
Anexo 10.- Fotografías



Aplicación de anestésico epidural previo a la recolección de embriones.



Lavado de la vaca donante para la recolección de embriones.



Embriones obtenidos luego del lavado realizado a las vacas donantes.



Chequeo del CL previo a la TE



Transferencia del embrión



Aplicación del Flunixin Meglumine por vía Intravenosa posterior a la TE.



Terneros producto de la TE

