



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**MAESTRIA EN REPRODUCCION ANIMAL**

**TITULO:**

**“Efecto de la bST aplicada al inicio de un programa superovulatorio con FSHp y al momento de la inseminación artificial sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones transferibles en vacas mestizas”**

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

**AUTORA: Doctora Sandra Elizabeth Bravo Mosquera. C.I.: 0103130282**

**DIRECTOR: Doctor Fernando Perea. C.I.: 0151638103**

**CUENCA, ECUADOR**

**2017**



## RESUMEN

La aplicación de somatotropina recombinante bovina (bST) al inicio de un tratamiento de superovulación (SOV) incrementa el número de folículos antrales que emergen en una onda folicular, mejora la respuesta superovulatoria e incrementa la tasa de embriones recuperados. El objetivo de este estudio fue evaluar la cantidad y calidad de embriones obtenidos en respuesta a la aplicación de somatotropina recombinante bovina (bST) en dos momentos clave de un tratamiento de superestimulación ovárica. Se utilizaron 40 vacas mestizas con una condición corporal entre 2,75 a 3 en la escala de 1 a 5, en edades comprendidas entre 30 a 60 meses, clínicamente sanas y sin alteraciones reproductivas aparentes. El protocolo de SOV utilizado consistió en la aplicación de un dispositivo intravaginal de progesterona por 6 días y con 4 dosis decrecientes diarias de FSH-p a partir del día 4, divididas en dos aplicaciones por día (50, 40, 30 20 mg de FSH × 2). Las hembras fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos: GH0 (grupo control; n=10) sin bST; GH1 (n=10) una dosis de 500 mg de bST al inicio del tratamiento; GH2 una dosis de bST al momento de la primera inseminación (día 8); GH3 dos dosis de 500 mg bST, el día 0 y el día 8 de iniciado el tratamiento. Los embriones fueron recuperados mediante un método no quirúrgico 7 días después de la primera IA (día 15). Mediante ecografía se determinó que el grupo control tuvo mayor número de cuerpos lúteos que los grupos tratados con bST ( $13,9 \pm 9,2$  versus  $8,0 \pm 4,0$ ,  $7,1 \pm 3,6$  y  $9,0 \pm 4,4$  para GH1, GH2 y GH3 respectivamente;  $P > 0,05$ ). El número total de estructuras recuperadas (ovocitos y embriones), embriones degenerados y ovocitos no fecundados no difirieron entre tratamientos, aunque en todos los casos el coeficiente de variación fue considerablemente menor en GH3 y GH2 que en los demás grupos. El porcentaje de embriones transferibles fue estadísticamente similar entre tratamientos, cuyos valores oscilaron entre 74,1% en GH0 y 80,2% en GH1, con valores intermedios en los demás tratamientos. Se concluye que la aplicación de bST al inicio del tratamiento de SOV y/o al momento de la IA no mejoró la respuesta superovulatoria ni el número de embriones transferibles recuperados.

Palabras clave: bST, superovulación, vacas mestizas, embriones transferibles.



## ABSTRACT

Application of bovine recombinant somatotropin (bST) at the beginning of a superovulation treatment (SOV) increased the number of antral follicles that emerged in a follicular wave, improved the SOV response and increased the rate of embryos recovered. A study was conducted with the objective of evaluate the quantity and quality of embryos obtained in response to the application of bST in two strategic moments of an ovarian super stimulation treatment. A total of 40 crossbred cows with a body condition between 2.75 and 3 on the scale of 1 to 5, clinically healthy and without apparent reproductive alterations were used. The cows were treated with an intravaginal progesterone device for 6 days (Day 0, beginning of the treatment) and with 4 daily decreasing doses of FSH-p from day 4, divided into two daily IM injections (50, 40, 30, 20 mg of FSH  $\times$  2). The females were randomly assigned to one of the following treatments: GH0 (control group; n=10) without bST; GH1 (n=10) a dose of 500 mg bST at day 0; GH2 a dose of bST at the time of the first insemination (IA) (day 8); GH3 two doses of 500 mg bST, at day 0 and 8 of the treatment. The embryos were recovered by a non-surgical method, 7 days after the first AI (day 15). Ultrasonography showed that the control group had a greater number of corpora lutea than the groups treated with bST ( $13.9 \pm 9.2$  versus  $8.0 \pm 4.0$ ,  $7.1 \pm 3.6$  and  $9.0 \pm 4.4$  for GH1, GH2 and GH3 respectively,  $P > 0.05$ ). The total number of structures recovered (oocytes and embryos), degenerate embryos and unfertilized oocytes did not differ between treatments, although in all cases the coefficient of variation was considerably lower in GH3 and GH2 than in the other groups. The percentage of transferable embryos was statistically similar between treatments, ranging from 74.1% in GH0 to 80.2% in GH1, with intermediate figures in the other experimental groups. It was concluded that the application of bST at the start of treatment with SOV and / or at the time of AI did not improve the superovulatory response nor the number of transferable embryos recovered.

Key words: bST, superovulation, crossbred cows, transferable embryos.



## INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INDICE DE CONTENIDOS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA .....	8
DERECHOS DE AUTOR.....	9
CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL .....	10
AGRADECIMIENTOS .....	11
DEDICATORIA .....	12
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	13
Objetivo general .....	15
Objetivos específicos.....	15
Hipótesis.....	15
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1. Fisiología Reproductiva de la hembra bovina .....	16
2.1.1. Control neuroendócrino del ciclo estral. Breve síntesis.....	16
2.1.2. Fases del Ciclo Estral Bovino .....	18
2.1.3. Dinámica folicular bovina.....	20
2.2. Historia de la transferencia de embriones en los bovinos.....	23
2.3. Situación actual y evolución de la transferencia de embriones en los bovinos	24
2.4. Superovulación .....	26
2.5. Tratamientos para la sincronización del celo .....	28
2.5.1. Tratamientos con progestina/progestágenos .....	28
2.5.2. Manipulación de la función ovárica: La ablación folicular .....	29
2.5.3. Tratamientos con estradiol y progesterona .....	29
2.6. Sincronización de celo e Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas superestimuladas.....	29
2.7. Selección de la Donante .....	30
2.8. Factores que afectan la superovulación .....	31
2.8.1. Factores externos.....	31



2.8.1.1.	Estado nutricional.....	31
2.8.1.2.	Calidad del semen .....	32
2.8.2.	Raza .....	32
2.8.3.	Factores fisiológicos .....	33
2.8.4.	Factores farmacológicos .....	34
2.9.	Importancia del examen clínico previo.....	34
2.10.	Características de la somatotropina recombinante bovina y su rol en la reproducción .....	35
2.11.	Usos de la Somatotropina Recombinante Bovina .....	36
2.12.	Mecanismos de acción mediante los cuales la bST mejora la respuesta superovulatoria .....	36
2.13.	Manipulación del tracto reproductor .....	38
2.14.	Recolección de los embriones.....	39
2.14.1.	Medios a utilizar .....	41
2.14.2.	Manipulación de los embriones.....	41
2.14.3.	Evaluación y clasificación de los embriones .....	42
3.1.	Materiales. ....	45
3.1.1.	Materiales Biológicos.....	45
3.1.2.	Materiales Físicos.....	45
3.1.3.	Materiales de Campo. ....	45
3.2.	Ubicación y características de las unidades de producción.....	46
3.3.	Caracterización de la unidad de análisis .....	46
3.4.	Tratamiento de superovulación.....	46
3.5.	Evaluación de los cuerpos lúteos .....	48
3.6.	Colecta, evaluación y clasificación de embriones.....	48
3.7.	Análisis Estadístico.....	48
CAPÍTULO IV: RESULTADOS .....		50
4.1.	Cuerpos lúteos.....	50
4.2.	Estructuras obtenidas .....	50
4.3.	Embriones transferibles .....	51
4.4.	Embriones degenerados.....	52
4.5.	Ovocitos sin fertilizar.....	52



4.6. Porcentaje de embriones transferibles .....	53
6.1. Conclusiones .....	58
6.2. Recomendaciones .....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	59
ANEXOS.....	65



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número (media $\pm$ error estándar) de cuerpos lúteos que resultaron de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas .....	50
Tabla 2. Número (media $\pm$ error estándar) de estructuras obtenidas (ovocitos y embriones) como resultado de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas.....	51
Tabla 3. Número (media $\pm$ error estándar) de embriones transferibles obtenidos como resultado de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas.....	52
Tabla 4. Número (media $\pm$ error estándar) de ovocitos sin fertilizar resultantes de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas.....	53
Tabla 5. Porcentaje de embriones transferibles luego de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas.....	53



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado de las interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Rippe, 2009).....	16
Figura 2. Perfil de hormonas durante el ciclo estral bovino (Rippe, 2009) .....	19
Figura 3. Principales eventos que se producen durante una onda folicular. (Driancourt, 2001).....	21
Figura 4. Producción mundial de embriones bovinos desde 1997 a 2013 según la IETS (Blondin, 2015). .....	25
Figura 5. Ovario bovino fotografiado durante un procedimiento de recuperación quirúrgica. (Seidel y Seidel 1991).....	27
Figura 6. Diagrama del procedimiento de lavado y recuperación del embrión. (Adaptado de Selk, 2002) .....	40
Figura 7. Posición del catéter de Foley para la descarga del cuerno uterino. (Seidel y Seidel, 1991.) .....	40
Figura 8. Esquema del desarrollo embrionario (Gardner y Watson, 2004).....	43
Figura 9. Embriones Bovinos: Ejemplos del Estado de Desarrollo y Calidad.....	43
Figura 10. Protocolo de superovulación en vacas mestizas tratadas o no con bST al inicio del tratamiento (día 0) y/o al momento la primera inseminación artificial. ....	47



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

CL: Cuerpo Lúteo

FSH: Hormona folículo estimulante

FSHp: Hormona folículo estimulante porcina

FIV: Fecundación In Vitro

GH: Hormona de crecimiento

GnRH: Hormona Liberadora de gonadotropinas

IA: Inseminación Artificial

IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria

IGF-1: Factor de Crecimiento Insulínico 1

LH: Hormona Luteinizante

P4: Progesterona

PBS: Solución Alcalina Buffer Fosfato

PGF2 $\alpha$ : Prostaglandina F2 alfa

bST: Somatotropina Recombinante Bovina

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

SOV: Superovulación

TE: Transferencia Embrionaria



## DERECHOS DE AUTOR



Universidad de Cuenca

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Sandra Elizabeth Bravo Mosquera en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Efecto de la bST aplicada al inicio de un programa superovulatorio con FSHp y al momento de la inseminación artificial sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones transferibles en vacas mestizas”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 28 de septiembre de 2017.

Sandra Elizabeth Bravo Mosquera

C.I: 0103130282



## CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL



Universidad de Cuenca  
Cláusula de Propiedad Intelectual

Sandra Elizabeth Bravo Mosquera, autora del trabajo de titulación “Efecto de la bST aplicada al inicio de un programa superovulatorio con FSHp y al momento de la inseminación artificial sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones transferibles en vacas mestizas”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 28 de septiembre de 2017.

Sandra Elizabeth Bravo Mosquera

C.I: 0103130282



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco ante todo a Dios por darme cada día de vida y la sabiduría para poder ir cumpliendo poco a poco mis metas.

A mi director, Dr. Fernando Perea y al M.V.Z. Daniel Argudo por su valiosa ayuda y apoyo incondicional para la culminación de este trabajo.

A mi familia, el motor que mueve mi vida, gracias por el apoyo y la paciencia de siempre, gracias por comprender mis ausencias y alentarme siempre a seguir adelante.

A todos quienes de una u otra forma me han apoyado a seguir adelante y alcanzar este objetivo.

Sandra Elizabeth



## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, la única razón para levantarme cada día y seguir adelante por el camino de la vida.

Sandra Elizabeth



## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

El progreso genético de las ganaderías bovinas se ha logrado incrementar exitosamente gracias a la investigación y al desarrollo de biotecnologías reproductivas que comprende técnicas que van desde la inseminación artificial (IA) hasta la clonación o el conjunto de ellas, lo cual también ha permitido mejorar la eficiencia reproductiva de los rebaños. Técnicas como la IA, han servido además, como herramienta para aplicar otras biotecnologías modernas como la superovulación y la transferencia de embriones (Palma, 2008).

Al implementarse un programa de superovulación y transferencia de embriones se debe tener presente que existen diferencias importantes tanto en la respuesta fisiológica como en el comportamiento reproductivo de las vacas tratadas, debido a múltiples factores que afectan la eficiencia de estos protocolos produciendo resultados con amplio rango de variación (Kanitz, Becker, Schneider, Kanitz, Leiding, Nohner y Pöhland, 2002). Dentro de estos factores cabe destacar los siguientes:

- El inconveniente que genera la necesidad de detectar los signos para determinar un celo que sirva de referencia para iniciar el tratamiento superovulatorio en el momento óptimo del desarrollo de la onda folicular.
- El alto porcentaje de donantes que no responden al tratamiento superovulatorio, por lo tanto no producen embriones.
- La gran variabilidad que presentan las donantes en la respuesta a los protocolos de superovulación que van desde obtener numerosos embriones de excelente calidad, a no obtener ninguna respuesta superovulatoria lo que afecta los resultados del tratamiento. Por esta razón, los ganaderos tienen dudas al momento de emprender un programa de superovulación ya que los costos de los mismos son elevados (Garzón, Urrego y Giraldo, 2007).

El factor de crecimiento insulínico (IGF-1) está comprobado que actúa estimulando la diferenciación de las células de la granulosa y la teca, la esteroidogénesis y la maduración de ovocitos, por lo que se considera que modula los efectos de las gonadotrofinas sobre el desarrollo folicular ovárico. Además de sus efectos sobre el desarrollo folicular, los factores de crecimiento, incluyendo el IGF-1, tienen amplios



efectos estimulantes o facilitadores sobre el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación de las primeras etapas en embriones de mamíferos. (Kuehner, Rieger, Walton, Zhao y Johnson, 1993).

La aplicación de somatotropina recombinante bovina (bST) al momento de la inseminación artificial (IA) puede mejorar las tasas de ovulación e incrementar la fertilidad en vacas donantes de embriones debido al estímulo que ejerce sobre el factor IGF-1 (Moreira, Paula, Hansen, Badinga y Thatcher, 2002), aumenta su concentración en plasma favoreciendo el desarrollo folicular, la respuesta superovulatoria y la tasa de recuperación de embriones transferibles. (Gong, Bramley, Wilmut y Webb, 1993; Gong, Wilmut, Bramley y Webb, 1996; Niswender, Juengel, Silva, Rollyson y McIntush, 2000; Moreira, Paula-Lopes, Hansen, Badinga y Thatcher, 2002; Lee, Hwang, Yoon, 2007). Además, la bST mejora el desarrollo embrionario y disminuye el número de ovocitos sin fecundar (Moreira, Badinga, Burnley y Thatcher, 2002).

La bST aplicada al inicio del protocolo de superovulación usando gonadotropinas mejora la calidad de los ovocitos porque va a actuar sobre los folículos antrales pequeños que emergen estimulando su crecimiento, y por ende, produce una mejor calidad de embriones haciendo que esta técnica sea más atractiva para los ganaderos (Garzón et al., 2007).

Un estudio realizado con vacas donadoras y receptoras de embriones, sugiere que los embriones obtenidos luego de un tratamiento de SOV utilizando bST en el protocolo, tienen mayor capacidad de producir interferón-tau lo que incrementa la tasa de supervivencia embrionaria durante el período de reconocimiento materno de la preñez, además incrementa la capacidad de los embriones para soportar mejor las etapas del proceso de transferencia a las receptoras (Moreira et al., 2002).

De acuerdo con lo descrito, puede preverse la existencia de dos efectos posibles después de la aplicación de bST en un programa de superovulación y transferencia de embriones. Uno de ellos es que la bST tiende a mejorar la respuesta al tratamiento de superovulación aumentando la cantidad de folículos antrales que continúan el desarrollo y llegarán a ovular, tal como fue previamente reportado



(Gong et al., 1996; Kuehner et al., 1993). El segundo efecto se observaría a través de la mejora del desarrollo embrionario después de la fertilización, y por lo tanto, el incremento de la tasa de gestación después de la transferencia (Moreira et al., 2002; Kuehner et al., 1993). Estos estudios se han realizado por separado, pero en ninguno de ellos se ha evaluado el efecto combinado de la aplicación de bST en dos momentos importantes de un tratamiento superovulatorio.

De esta manera para el estudio se planteó los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Evaluar la producción cuali-cuantitativa de embriones durante un tratamiento de superovulación al que le fue adicionada la aplicación de bST en dos momentos clave del tratamiento de superestimulación ovárica: al inicio y al momento de la inseminación.

### **Objetivos específicos**

Evaluar la respuesta fisiológica al tratamiento con hormona del crecimiento en el número total de estructuras obtenidas para luego clasificarlas y así comparar el número de embriones obtenidos y su calidad de acuerdo a las variaciones en los tratamientos.

Comparar la respuesta ante la aplicación de la hormona del crecimiento con el protocolo estándar aplicado al grupo control.

### **Hipótesis**

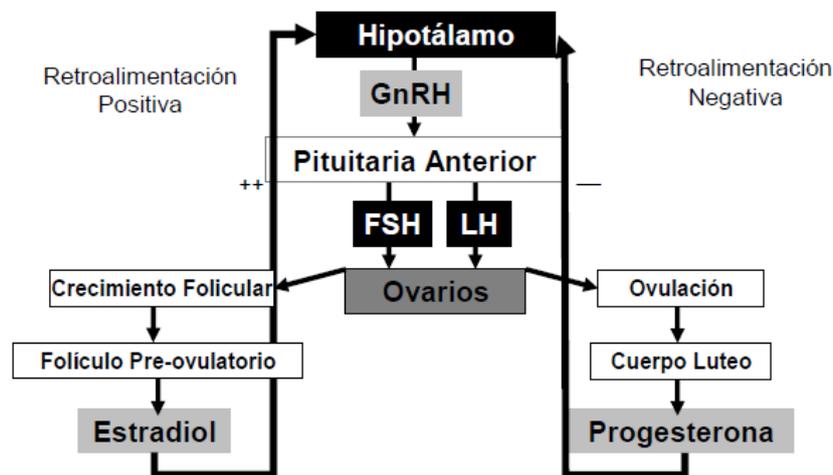
La producción cuali-cuantitativa de embriones se mejora con la aplicación de bST en dos momentos clave del tratamiento de superestimulación ovárica.

## CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fisiología Reproductiva de la hembra bovina

#### 2.1.1. Control neuroendócrino del ciclo estral. Breve síntesis.

La ciclicidad reproductiva en la hembra bovina está regulada por la interacción hormonal regida por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero (Figura 1) (Becaluba, 2007). En el hipotálamo se produce la hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH, cuya secreción pulsátil es regulada por las hormonas gonadales, estradiol y progesterona, y modificada por numerosos factores ambientales y condiciones fisiológicas y patológicas (Gutiérrez, 2008).



**Figura 1. Esquema simplificado de las interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Rippe, 2009).**

La glándula hipófisis está formada por un lóbulo anterior o adenohipófisis y uno posterior o neurohipófisis. Desde el punto de vista reproductivo, la adenohipófisis además de la prolactina (hormona que participa en el proceso de lactación), produce las gonadotropinas, es decir, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Ambas hormonas son glucoproteínas con un peso molecular de alrededor de 32.000 daltons, y cuya estructura molecular está constituida por dos subunidades, alfa y beta. La subunidad alfa es común a ambas gonadotropinas, mientras que la subunidad beta es diferente y le confiere la especificidad a cada una (Gutiérrez, 2008).



La secreción basal de FSH y LH es pulsátil, pero es interrumpida por la secreción ovulatoria de LH/FSH durante el estro, que es desencadenada por una descarga masiva de GnRH desde varias regiones del hipotálamo, debido a la elevada secreción de estradiol por el folículo dominante durante el proestro y estro.

La FSH es la hormona responsable del proceso de esteroidogénesis ovárica, y de estimular el crecimiento folicular, mientras que la LH estimula el crecimiento final y maduración del folículo dominante, en la esteroidogénesis ovárica, la ovulación y la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (Gutiérrez, 2008).

La neurohipófisis almacena la oxitocina producida por los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular y tiene funciones en el proceso del parto, en la bajada de la leche, transporte espermático y la luteólisis (Rippe, 2009).

Las estructuras funcionales del ovario producen estrógenos, progesterona e inhibina. Los estrógenos producidos por el folículo actúan sobre los órganos blanco como los oviductos, útero, vagina y vulva, creando las condiciones fisiológicas que favorecen el transporte de los gametos y la fecundación. Asimismo, la acción de los estrógenos en el sistema nervioso central estimula la conducta de celo (Rippe, 2009).

La progesterona producida por el cuerpo lúteo en respuesta a numerosas sustancias luteotrópicas, en especial la LH, prepara el útero para proveer las condiciones fisiológicas necesarias para el desarrollo temprano del embrión, la implantación y el mantenimiento de la gestación y la inhibina producida por el folículo ovárico ejerce un efecto de retroalimentación (feedback) negativa a nivel hipofisiario, suprimiendo la secreción de FSH. (Rippe, 2009).

El útero produce prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) que interviene en la regulación endócrina del ciclo estral mediante su efecto luteolítico. La  $PGF2\alpha$  uterina actúa a través de su receptor de membrana localizado en las células luteínicas grandes y estimula la secreción de  $PGF2\alpha$  luteal y otros numerosos factores que a través de una sucesión de eventos tisulares coordinados modulan la luteólisis funcional y estructural. Asimismo, esta hormona también tiene funciones en los mecanismos de ovulación y parto (Rippe, 2009).



## 2.1.2. Fases del Ciclo Estral Bovino

Durante el ciclo estral ocurren numerosos eventos funcionales y morfológicos que han sido asociados a cuatro etapas o fases: (Figura 2)

Fase folicular (Proestro): dura aproximadamente tres días, se inicia con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo y finaliza con el inicio del celo. Durante el proestro, el patrón de secreción de LH que estaba suprimido por la elevada concentración de P4 durante el diestro cambia, aumentando el número y la amplitud de los pulsos que estimulan el crecimiento, maduración y secreción de cantidades crecientes de estradiol folicular (Rippe, 2009).

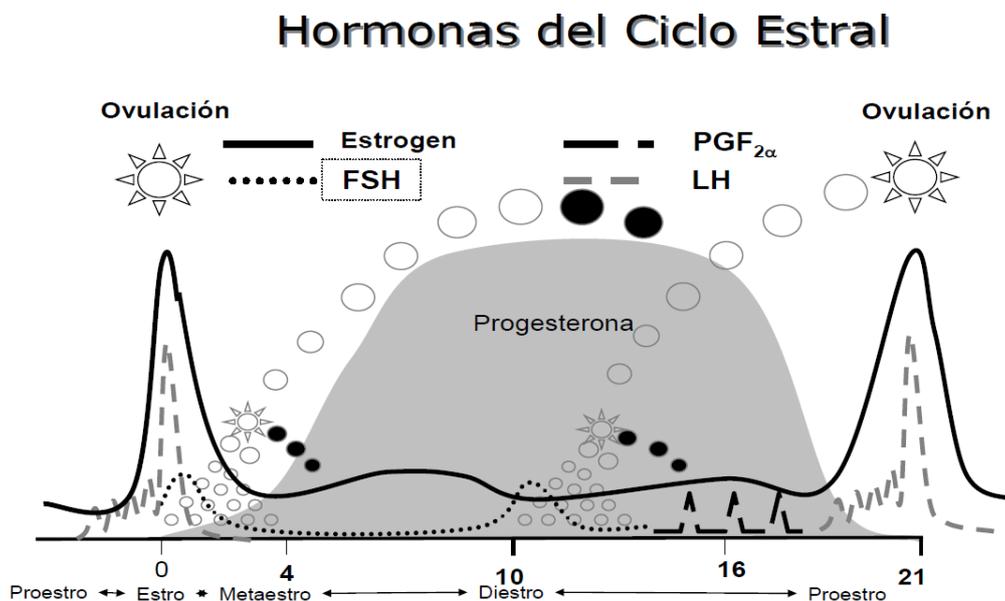
Fase periovulatoria (estro-metaestro): suele prolongarse por un periodo de 12 a 18 horas, lapso durante el cual la vaca manifiesta inquietud, ansiedad y baja la producción láctea. Durante esta fase, las altas concentraciones de estrógenos estimulan el incremento de la frecuencia de los pulsos de GnRH por las neuronas hipotalámicas, y en consecuencia aumenta progresivamente la frecuencia pulsátil de LH que conduce a la descarga ovulatoria de LH/FSH y que provoca la ovulación. Estos eventos preceden el inicio del metaestro, que en el caso de la vaca es el período en donde ocurre la ovulación, que es seguida por la luteinización del folículo ovulado y el desarrollo temprano del cuerpo lúteo. La ovulación ocurre 28 a 32 horas de iniciado el celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH (Rippe, 2009).

Durante la fase luteal (diestro) está presente en el ovario un cuerpo lúteo funcional que produce grandes cantidades de progesterona (Rippe, 2009). Si el ovocito no es fecundado, el cuerpo lúteo permanece funcional hasta el día 15 a 20, para luego experimentar regresión por la acción de la  $PGF2\alpha$  secretada por los cálices endometriales de las células que recubren el endometrio, lo cual prepara el inicio de un nuevo ciclo estral (Becaluba, 2007).

Según, (Hernández y Zarco, 1998), el cuerpo lúteo (CL) es una glándula temporal que se desarrolla a partir del folículo ovulatorio que luego de un proceso conocido como luteinización, que consiste en varios cambios morfológicos, endocrinos y enzimáticos, se transforma en un cuerpo lúteo funcional.

Después de la ovulación se incrementa la síntesis de progesterona, y en el día 4 o 5 después de la ovulación esta hormona alcanza concentraciones plasmáticas mayores a 1 ng/ml, constituyendo el momento cuando el CL alcanza su plena funcionalidad (Hernández y Zarco, 1998).

La progesterona es el principal producto de secreción del CL; actúa sobre los genitales de la hembra y prepara al útero para el establecimiento y mantenimiento de la gestación, además evita las contracciones del útero, cierra el cérvix y modifica las características del moco cervical volviéndolo más viscoso, lo cual evita el paso de agentes extraños al interior del útero. Asimismo, regula los cambios que se necesitan en el oviducto y el útero para el desarrollo embrionario, y modula las secreciones uterinas de las cuales los embriones recibirán los nutrientes y otras sustancias necesarias para su crecimiento y diferenciación. Normalmente la progesterona ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ya que suprime la formación de los receptores de estradiol en el endometrio, por lo cual esta hormona no puede estimular la síntesis de receptores a oxitocina que aparentemente son importantes para iniciar el proceso de luteolisis (Hernández y Zarco, 1998).



**Figura 2. Perfil de hormonas durante el ciclo estral bovino (Rippe, 2009)**



La secreción pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$  se inicia al final del diestro y continúa hasta que se completa la regresión del CL. No obstante, cuando no se establece el patrón luteolítico de secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  apropiado el CL no se destruye y persiste provocando que el ciclo estral se prolongue más de lo normal. El momento que ocurre la luteolisis depende fundamentalmente del momento en que se establece un patrón pulsátil frecuente de secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ . (Hernández y Zarco, 1998).

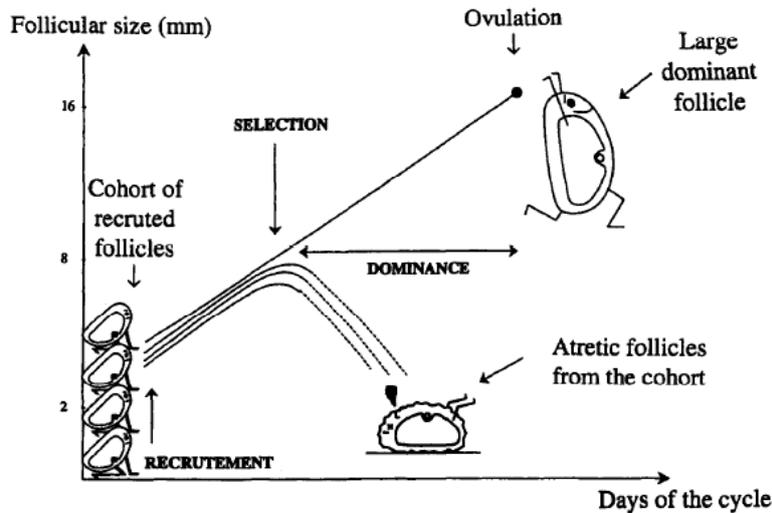
El funcionamiento anormal del cuerpo lúteo se ha relacionado con la muerte embrionaria temprana. Esto se observa más comúnmente en vacas en lactación con balance energético negativo en las primeras seis semanas posparto, también se observa en vacas sometidas a estrés calórico en las que se ha observado menor producción de progesterona. Al haber menos niveles de progesterona el desarrollo del embrión será más lento y además tendrá menor capacidad de producir interferón-tau (Hernández y Zarco, 1998).

### **2.1.3. Dinámica folicular bovina**

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conduce al desarrollo de un folículo preovulatorio. En un ciclo estral bovino pueden ocurrir de una a cuatro ondas foliculares (Becaluba, 2007).

Según (Driancourt, 2001), independientemente del estado fisiológico, los ovarios de todas las especies de animales de granja contienen un gran stock de folículos primordiales, una población más limitada de folículos secundarios (preantrales) (100-1000) y varias decenas de folículos antrales (50 a 300).

La sucesión recurrente de una secuencia de eventos ováricos a lo largo del ciclo estral, que incluye el reclutamiento de un grupo de folículos antrales pequeños, la selección y dominancia de uno de ellos que potencialmente puede llegar a ovular, se llama "ondas foliculares" y se describe a continuación: (Figura 3)



**Figura 3. Principales eventos que se producen durante una onda folicular. (Driancourt, 2001).**

En el reclutamiento, una cohorte de pequeños folículos antrales comienza su fase final de crecimiento en respuesta a un incremento transitorio de secreción de FSH, que da inicio a una fase del desarrollo folicular dependiente de las gonadotropinas.

En los bovinos, la selección implica que uno de los folículos que está mejor dotado para crecer en un ambiente con baja concentración de gonadotropinas, continúa creciendo mientras que los demás folículos de su cohorte crecen a un ritmo menor y finalmente se atresian. Esta fase se prolonga por aproximadamente dos días, y a pesar de que todos los folículos reclutados son FSH dependientes, los niveles circulantes bajos de esta gonadotropina no permiten que todos progresen a un ritmo similar, y solo aquel que tiene mejores condiciones metabólicas para crecer que los demás de su cohorte, será capaz de continuar su desarrollo y convertirse en un folículo dominante, que eventualmente puede llegar a ovular. Esta etapa es crucial en el tratamiento superovulatorio ya que la falta de FSH endógena es suplida con cantidades elevadas de FSH exógena. Todos los folículos de la cohorte son potencialmente capaces de ovular (Driancourt, 2001).

Durante la dominancia folicular, el folículo seleccionado se hace morfológicamente (más grande) y funcionalmente (produce más estradiol) dominante, y suprime el crecimiento de los demás folículos de su cohorte que progresivamente van experimentando atresia folicular. Mientras que esto ocurre no se produce



reclutamiento de una nueva cohorte de folículos, pues hay una relación directa entre la presencia del folículo dominante y la ausencia del reclutamiento (Driancourt, 2001).

El reclutamiento de las ondas foliculares y la selección del folículo dominante se basan en la capacidad de respuesta diferencial de los folículos a la FSH y LH. En cada onda, el folículo dominante adquiere receptores de LH y continúa creciendo mientras que los subordinados (que siguen dependiendo solo de FSH) experimentan un proceso de atresia (Driancourt, 2001).

Normalmente, cuando una onda inicia su crecimiento durante el metaestro o diestro, como consecuencia de los niveles elevados de progesterona producidos por el cuerpo lúteo, se suprime la secreción de LH lo que provoca que el folículo dominante cese sus funciones metabólicas, deje de producir grandes cantidades de estradiol y se atresie. Esto conduce a un nuevo incremento de la FSH y al reclutamiento de una nueva onda folicular (Driancourt, 2001).

Sin embargo, la regresión del cuerpo lúteo al final del diestro, y la abrupta caída de la concentración de P4 circulante, reduce el bloqueo que esta hormona ejerce en el hipotálamo e hipófisis, y permite que aumente la frecuencia de pulsos de LH y que el folículo dominante presente en los ovarios en ese momento aumente su crecimiento; como consecuencia, este aumenta la producción y la concentración circulante de estradiol y a través de un mecanismo de estimulación recíproca entre el estradiol folicular y la LH se estimula al eje hipotálamo-hipófisis y se desencadena el pico de LH/FSH que provoca la ovulación (Mapletoft, Bó y Baruselli, 2009).

Basándose en los procesos fisiológicos que ocurren durante el ciclo estral de la vaca previamente descritos, los investigadores han desarrollado diversas biotécnicas reproductivas como la inseminación artificial a tiempo fijo, la superovulación y transferencia de embriones, etc., con la finalidad de obtener mayor número de crías con características genéticamente superiores, y así lograr una aceleración de la mejora genética de los rebaños (Bó, Baruselli y Chesta, 2006).

La baja eficiencia y el trabajo necesario para una efectiva sincronización y detección de celos continúa siendo un factor limitante en el uso de las biotécnicas.



Hay muchos factores que pueden afectar la detección de celos como: insuficiente tiempo de observación del celo, desconocimiento de los signos de celo, mal uso de los dispositivos detectores de celo y una inoportuna detección del inicio del celo. Por ello se han desarrollado protocolos de sincronización de la ovulación que se combinan con la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en los programas de superovulación, es decir, que en estos programas no es necesaria la detección de celos (Bó et al., 2006).

## **2.2. Historia de la transferencia de embriones en los bovinos**

Heape en 1891, realizó las primeras transferencias de embriones (TE) con éxito mostrando que los conejos de una raza pueden ser gestados en el tracto reproductivo de las hembras de otra raza sin que les afecte el ambiente uterino.

Más de un siglo después, la TE ha sido fundamental para las investigaciones sobre cuán profundamente embriones, fetos y crías pueden ser afectados por su primer ambiente, in vivo o in vitro (Betteridge, 2003).

Los primeros pasos hacia la investigación de los caracteres reproductivos en las hembras se iniciaron en 1929 por G. Pincus, miembro del Consejo Nacional de Investigación de la Universidad de Harvard, basándose en la labor iniciada previamente por Heape, quien cultivó los huevos fertilizados de coneja fuera del cuerpo y posteriormente los transfirió con éxito en otra coneja.

Esto se hizo con la aplicación exógena de hormonas de la hipófisis anterior, y con ello se pudo obtener más de cincuenta huevos fertilizados de una sola vez para este propósito. Además, en 1936 Pincus demostró la tolerancia del embrión a la falta de sincronía para su desarrollo temprano en el oviducto obteniendo los primeros blastocistos a partir de embriones de 2 células transferidos en el oviducto de conejas en celo y que por ende carecían de cuerpo lúteo. Este conocimiento pasó a ser muy importante para el desarrollo de la transferencia de embriones (Betteridge, 2003).

La inseminación artificial (IA) es una de las tecnologías utilizadas en los programas de mejora genética con gran aceptación entre los productores de ganado por su relación costo/eficiencia. A pesar de ser la técnica más utilizada en estos programas



(más de 200 millones de vacas son inseminadas en el mundo por año) con esta tecnología la genética materna permanece sin ser explotada, debido que en forma natural la hembra bovina puede tener solo una cría al año si es reproductivamente eficiente. Por el contrario, mediante la superovulación (SOV) y la TE, el genotipo materno es revalorizado y adquiere una considerable influencia sobre la mejora genética del rebaño, debido a la posibilidad de multiplicar varias veces el número de descendientes por vaca, lo cual acelera el progreso genético con la contribución de ambos sexos (Colazo y Mapletoft, 2007).

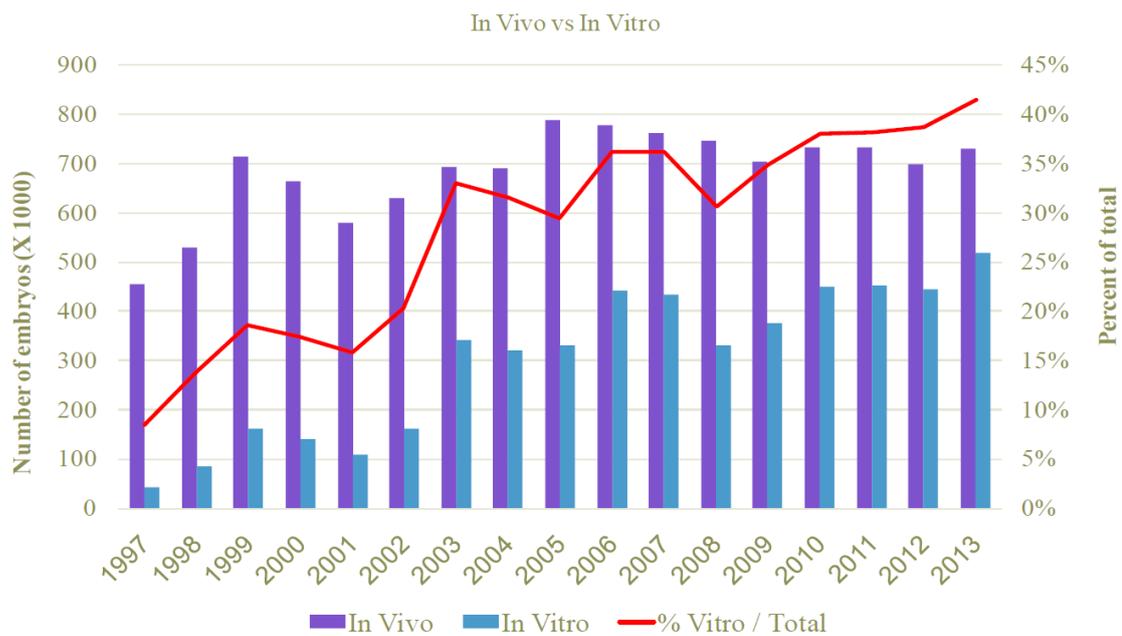
La primera transferencia de un embrión bovino se informó en 1949, y el primer ternero obtenido mediante transferencia de embriones en 1951 (Seidel y Seidel, 1991) y su aplicación en la industria ganadera se inició en la década de 1970 cuando las razas de ganado de doble propósito europeas se hicieron populares en América del Norte, Australia y Nueva Zelanda. (Colazo y Mapletoft, 2007).

Actualmente las técnicas han mejorado y hay un sustancial desarrollo de los procedimientos para la recuperación no quirúrgica, la transferencia y la crioconservación de embriones con una notable reducción de costos. Con estas mejoras y una motivación económica más realista, la transferencia de embriones ahora juega un papel útil en las industrias ganaderas de muchos países (Seidel y Seidel, 1991).

### **2.3. Situación actual y evolución de la transferencia de embriones en los bovinos**

La evolución de la producción in vivo de embriones incrementó significativamente entre 1997 y la actualidad (Blondin, 2015). Cada año, la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) publica los datos estadísticos sobre la actividad de TE en el mundo. En el 2013 se produjeron alrededor de 700 mil embriones in vivo.

La (Figura 4) ilustra la evolución in vivo e in vitro de la producción de embriones entre 1997 y 2013 según datos recopilados en cuarenta países presentados por la IETS en marzo del 2015.



**Figura 4. Producción mundial de embriones bovinos desde 1997 a 2013 según la IETS (Blondin, 2015).**

La producción de embriones mediante fecundación in vitro (FIV) se ha incrementado año tras año con un máximo histórico de más de medio millón de embriones fecundados in vitro en 2013, que representa el 42% del total de embriones producidos ese año. Es importante tomar en cuenta que el 73% de embriones obtenidos mediante FIV fueron producidos en Sudamérica mientras que el 22% en Norteamérica (Blondin, 2015).

El principal objetivo de los programas de SOV es producir un gran número de ovulaciones a partir de una hembra y obtener un número máximo de embriones transferibles, (Becaluba, 2007) para de esta forma incrementar las tasas reproductivas de hembras de alto valor genético.

Una de las principales limitantes para un mayor desarrollo de esta tecnología ha sido la gran variabilidad en las respuestas a los tratamientos de superovulación y a la producción de embriones lo que causa problemas tanto en la eficiencia como en la rentabilidad de esta técnica lo cual limita su aplicación en los programas de mejoramiento genético (Becaluba, 2007, Mapletoft, Tribulo y Bó, 2011).

Existe una amplia variabilidad en la respuesta a los tratamientos para producir la



superovulación, variabilidad que según Becaluba, (2007), está relacionada con factores tales como las gonadotrofinas y los protocolos utilizados, la genética de las hembras tratadas, la variación individual, el estado fisiológico del animal tratado y factores ambientales que causan estrés.

Todas estas limitantes repercuten directamente sobre los resultados finales (crías producidas) y por lo tanto sobre los costos lo cual afecta seriamente el nivel de acogida de esta técnica en el medio ganadero. Sumado a esto, están otros factores más locales e incluso culturales y de nivel de profesionalización de las distintas zonas (Bello, 2008).

A pesar de que se ha investigado mucho, no ha habido un mejoramiento considerable en la cantidad y calidad de embriones producidos por tratamiento superovulatorio, lo cual ha hecho necesario aumentar el conocimiento de la función ovárica lo que ha derivado en el desarrollo de protocolos de sincronización de la onda folicular, permitiendo iniciar los tratamientos superovulatorios en cualquier momento del ciclo estral, evitando así la necesidad de la detección del celo (Bo y Mapletoft, 2014).

Además, se ha investigado el uso de otros fármacos que permitan obtener una mejor respuesta con el uso de los protocolos de SOV y TE como lo es el caso de la Hormona de Crecimiento (Colazo y Mapletoft, 2007).

## **2.4. Superovulación**

El potencial reproductivo de una cría al nacer es enorme ya que cuenta con un número aproximado de 150.000 "huevos" potenciales en la hembra púber y miles de millones de espermatozoides producidos por cada macho. El toro del rebaño promedio procreará de 15 a 50 terneros por año, mientras que una vaca tendrá como máximo un ternero al año debido a que es un animal monotoco, por lo que generalmente libera solo un óvulo por ciclo estral (Selk, 2002).

Con la IA es posible aprovechar el gran número de espermatozoides producidos por un toro genéticamente superior para obtener un sinnúmero de descendientes, contrario a lo que sucede con las hembras que bajo programas normales de

reproducción, producirán un promedio de 8 a 10 crías durante toda su vida productiva. Así como la IA sirve para aprovechar el potencial del toro, la TE es una técnica que puede aumentar en gran medida el número de descendientes que una vaca genéticamente importante puede producir en condiciones de un manejo reproductivo normal (Selk, 2002).

El éxito de un programa de TE se mide por el número de terneros que nacen vivos por cada hembra donante en un determinado lapso de tiempo (Bó, et al., 2006). Los protocolos de SOV tienen como principal objetivo estimular el desarrollo de una gran cantidad de folículos en cada programa implementado, con la finalidad de que ovulen muchos de ellos y que luego de la IA se obtengan el máximo número de embriones transferibles que derivará en una mayor cantidad de terneros producidos (Mapletoft et al., 2011).



**Figura 5. Ovario bovino fotografiado durante un procedimiento de recuperación quirúrgica. (Seidel y Seidel 1991).**

En estudios realizados en la década de los 80` se demostró que los tratamientos superovulatorios iniciados durante los días 9 o 10 después de detectado el celo presentaban mejor respuesta superovulatoria que los que inician antes (día 2-6) o después (día 12-13). La segunda onda folicular inicia entre los días 9 y 10 del ciclo estral. Sin embargo, existen variaciones individuales y la segunda onda puede iniciarse antes o después de lo indicado anteriormente, motivo por el cual la



respuesta puede ser muy variable y el resultado del programa de SOV poco efectivo. (Garzón et al., 2007).

Estudios recientes demuestran que los tratamientos superovulatorios deben iniciarse al comienzo de una onda de desarrollo folicular antes de la selección del folículo dominante, ya sea de la primera o la segunda onda folicular, para obtener la mejor respuesta posible (Garzón et al., 2007). Pero existe una probabilidad del 20% de que el comienzo de la SOV coincida con el inicio de una onda folicular, lo que significa que entre el 80 a 90 % de las veces la SOV no se inicia en el momento oportuno, y por lo tanto, los resultados serán deficientes. (Garzón et al., 2007; Bó y Mapletoft, 2014).

En la actualidad, una alternativa para optimizar los tratamientos de SOV es controlando la dinámica folicular mediante la sincronización de la onda folicular en un momento aleatorio del ciclo estral, sin necesidad de detectar el celo, lo que permite incrementar la eficiencia de los programas de TE (Bó y Mapletoft, 2014).

Como ya se mencionó previamente, antes se iniciaban los tratamientos de SOV con la aplicación de gonadotropinas a la mitad del ciclo (8-12 días después del celo). No obstante, recientemente se ha demostrado que la respuesta superovulatoria es mayor cuando los tratamientos con gonadotropinas son iniciados en el preciso momento en que emerge la onda folicular, para lo cual resulta necesario sincronizar el ciclo estral en los grupos de animales a ser tratados (Mapletoft et al., 2011).

## **2.5. Tratamientos para la sincronización del celo**

### **2.5.1. Tratamientos con progestina/progestágenos**

La P4 altera la función ovárica mediante la supresión del estro y la ovulación, ya que inhibe la producción de LH y detiene el crecimiento del folículo dominante. Cabe mencionar que la progesterona no inhibe la secreción de FSH, por lo cual las ondas foliculares continúan desarrollándose en presencia de un CL funcional, pero por falta de un patrón de secreción de LH adecuado no se produce la ovulación. Los dispositivos intravaginales que liberan progesterona se usan para sincronizar el estro en el ganado. Se retiran de 7 a 8 días después de colocados y se aplica PGF2 $\alpha$  para



inducir la luteólisis de un posible cuerpo lúteo presente en los ovarios. En este esquema, la detección del celo comienza 48 horas después de eliminarse la fuente exógena de progestina (Mapletoft et al., 2009).

### **2.5.2. Manipulación de la función ovárica: La ablación folicular**

Con esta metodología se elimina el folículo dominante presente mediante la ablación transvaginal guiada por ultrasonido, lo que dará lugar a la emergencia de una nueva onda folicular debido a la eliminación de los efectos supresores del folículo dominante.

La ablación folicular en combinación con la PGF2 $\alpha$  es muy eficaz en la sincronización del estro y la ovulación, pero su uso no es práctico a nivel del campo (Mapletoft et al., 2009).

### **2.5.3. Tratamientos con estradiol y progesterona**

Investigaciones demostraron que el tratamiento con estradiol suprime el crecimiento de los folículos antrales mediante un mecanismo que parece ser sistémico ya que implica la supresión de secreción de FSH. Luego de que se metaboliza el estradiol exógeno hay un aumento de la secreción de FSH y surge una nueva onda folicular.

De acuerdo a esto, en los protocolos de sincronización del estro, el estradiol es inyectado al momento de la inserción de un dispositivo de progestágenos, el cual se retira 7-8 días más tarde, junto con la aplicación de PGF2  $\alpha$ . Una dosis más baja de estradiol se aplica normalmente 24 horas después de retirarse el dispositivo de progestágenos o progesterona, con la finalidad de inducir un aumento de LH y la posterior ovulación que ocurrirá aproximadamente entre 24 y 32 horas después (Mapletoft et al., 2009).

## **2.6. Sincronización de celo e Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas superestimuladas**

El protocolo convencional que consiste en iniciar la superestimulación ovárica durante la mitad del ciclo se basó originalmente en la información experimental de



que la respuesta superovulatoria mejoraba cuando los tratamientos con gonadotropina se iniciaban 8 a 12 días después del estro. Hoy se sabe que 8 a 12 días después del estro sería el tiempo aproximado de emergencia de la segunda onda folicular (Bó y Mapletoft, 2014).

En la actualidad, las vacas reciben un dispositivo intravaginal de progestina en cualquier fase del ciclo estral, y una inyección de estradiol más progesterona al momento de colocarse el dispositivo. Esto produce la regresión de los folículos presentes y aproximadamente cuatro días después se inicia una nueva onda folicular, y en coincidencia con ello, el tratamiento con gonadotropinas durante alrededor de 4 días (Bó et al., 2004). En el día 3 del tratamiento con progestágenos (día 7 del ciclo estral) se aplica PGF2 $\alpha$  y 24 h más tarde se retira el dispositivo con progestágenos (Bó y Mapletoft, 2014). Las vacas son inseminadas 12 y 24 horas después del estro. Siete días más tarde se realiza la colecta de embriones y posteriormente las vacas reciben una dosis de PGF2  $\alpha$ .

Debido a la liberación de muchos óvulos de los múltiples folículos en el ovario, se requiere una mayor seguridad de que más espermatozoides viables lleguen al oviducto de una hembra superovulada. Por lo tanto, muchos técnicos de transferencia de embriones elegirán inseminar la vaca varias veces durante y después del estro. Un esquema que se ha utilizado con éxito es inseminar la vaca superovulada a las 12, 24 y 36 horas después del inicio del celo (Selk, 2002).

## **2.7. Selección de la Donante**

Los criterios de selección de una vaca para aplicarle un tratamiento de SOV tienen que basarse en los registros de desempeño, y su potencial genético debe justificar el gasto que significa este procedimiento, que aunque es costoso, el éxito del mismo garantiza la recuperación de la inversión por el aumento de la calidad genética del rebaño, a mediano plazo. La vaca donante potencial debe ser reproductivamente sólida para procurar obtener resultados óptimos. Debe tener un tracto reproductivo normal a la evaluación ginecológica, un historial postparto normal, celos regulares que comiencen a una edad temprana, sin dificultades de parto ni irregularidades en la reproducción, y que no tenga defectos genéticos (Selk, 2002).



## **2.8. Factores que afectan la superovulación**

Para obtener una respuesta superovulatoria satisfactoria se debe tener en cuenta la disponibilidad de un adecuado número de folículos antrales sensibles al estímulo gonadotrófico al inicio del tratamiento de SOV, y la ausencia de un folículo dominante. Esta respuesta va a depender principalmente de la dinámica folicular de cada animal, que es regida por factores ováricos y por el sistema neuroendocrino, y por lo tanto, es sensible al medio interno y externo del organismo que es muy difícil predecir en condiciones de campo, lo que deriva en una amplia variabilidad de la respuesta a estos tratamientos (Becaluba, 2007).

Sumado a esto, existen otros factores que afectan la respuesta superovulatoria, dentro de los cuales se mencionan los siguientes:

### **2.8.1. Factores externos**

Estos factores pueden afectar de una manera directa o indirecta la respuesta superovulatoria, los principales se mencionan a continuación:

#### **2.8.1.1. Estado nutricional**

Según Becaluba, (2007), el nivel de energía de la ración puede influir tanto en las tasas de ovulación y de fecundación como en la viabilidad de los embriones. Así, la respuesta superovulatoria está correlacionada positivamente con la condición corporal y el estatus nutricional. Además, se ha comprobado que las donantes mantenidas a pastoreo tuvieron más embriones que las estabuladas.

Tanto la vaca muy obesa como la vaca delgada tendrán una fertilidad reducida, por lo que es importante que las hembras donantes se encuentren en una condición corporal adecuada desde 2,75 a 3 en la escala de 1 a 5 (Edmonson, Lean, Weaver, Farver y Webster, 1989), al momento de someterlas al tratamiento de superovulación. Para garantizarse el éxito de un programa de SOV, las vacas donantes deben tener un nivel de nutrición apropiado para su tamaño y nivel de producción de leche (Selk, 2002).



### **2.8.1.2. Calidad del semen**

El uso de semen de alta calidad con un alto porcentaje de células normales móviles se considera un aspecto muy importante en cualquier programa de TE, (Selk, 2002) pues la recuperación solamente de ovocitos o embriones de mala calidad puede deberse a la calidad del semen y no necesariamente a la respuesta superovulatoria (Jimenez, 2009).

Debido a la ovulación múltiple desde los folículos ováricos superestimulados, se requiere una mayor necesidad de asegurarse que un número suficiente de espermatozoides viables llegarán a los oviductos de las hembras superovuladas, por lo tanto, muchos profesionales en transferencia de embriones prefieren inseminar la vaca varias veces durante y después del estro. Además se considera que el sitio correcto para la colocación del semen es el cuerpo del útero, ubicado en un punto justo delante del cuello uterino (de 1/2 a 1 pulgada) ya que si se deposita demasiado profundo o en uno de los cuernos uterinos, se reduce la fertilidad si las ovulaciones se producen en el ovario opuesto (Selk, 2002).

### **2.8.2. Raza**

Comparando el ganado *Bos taurus*, con las razas *Bos indicus* se pueden encontrar varias diferencias en su fisiología reproductiva. Por ejemplo, en el ganado *Bos indicus*, el diámetro de los folículos en el momento en el que adquieren la capacidad ovulatoria es menor, tienen una duración del estro más corta y este se presenta con mayor frecuencia en la noche (Becaluba, 2007). A pesar de que el ganado *Bos indicus* responde a los tratamientos con estradiol y progesterona con la aparición sincrónica de una nueva onda folicular, tienden a ser más sensibles a las hormonas esteroides que el ganado *Bos taurus*, por lo cual, (Barucelli et al., 2006), recomendaron tener en cuenta estas diferencias al momento de establecerse un programa de transferencia de embriones para bovinos *B. indicus*.

En diferentes estudios se ha demostrado, por ejemplo, que las vacas Holstein requerían una proporción mayor de FSH mientras que las vacas Charolais requerían una proporción mayor de LH para lograr la máxima respuesta superovulatoria (Becaluba, 2007).



### 2.8.3. Factores fisiológicos

Una respuesta adecuada al tratamiento de SOV está determinada por factores como el estatus ovárico de la vaca al inicio del tratamiento y los mecanismos fisiológicos y genéticos que afecten esta respuesta. Además factores como la raza, la edad, el número de partos, el estado lactacional, la fertilidad de la vaca, el estatus sanitario y la individualidad son determinantes para emprender un tratamiento de SOV (Jimenez, 2009).

En cuanto a la edad y al estado de lactancia hay estudios que demuestran que las tasas de preñez de embriones transferidos de vacas mayores de 15 años eran más bajas (Jiménez, 2009), además en otros estudios se demostró que en vacas Holstein no lactantes se obtuvieron más de 100% de embriones transferibles que fueron de mejor calidad que los recuperados en vacas lactantes

Se demostró que las vacas no lactantes tienen una respuesta significativamente mejor al protocolo de superovulación comparado con las vacas lactantes, pues en su estudio se obtuvo un mayor número de embriones transferibles. La ventaja observada sobre las vacas lactantes en el número de embriones transferibles fue debido a la mejor respuesta ovárica después de la superovulación ya que el desarrollo embrionario temprano después de la fertilización no pareció verse afectado por la lactancia. (Moreira et al., 2002).

Otro estudio reveló que en ganado lechero el número de embriones transferibles obtenidos en donantes cuyas edades estaban comprendidas entre 3 y 6 años, fue mayor que el que se logró en vaconas y primíparas. Existe una interacción entre la edad de la donante y la dosis de gonadotropina ya que cuando se usa dosis elevadas en animales jóvenes provoca una sobre estimulación ovárica debido a la incapacidad del ovario de albergar tantos folículos. Se observó además que a mayor edad de la donante disminuye el número de ovulaciones, la tasa de fecundación y la calidad embrionaria (Becaluba, 2007).

Por todo lo expuesto el mismo autor concluye que para lograr un alto número de embriones transferibles la dosis de gonadotropina debe ajustarse a la edad de la donante.



#### **2.8.4. Factores farmacológicos**

Se debe considerar el tipo de FSH y la presentación comercial. Dentro de los productos comerciales hay variación de la potencia, dada en muchos casos por la relación FSH/LH. Los resultados también pueden variar según la dosis total, si se usan dosis decrecientes o constantes, los intervalos de dosificación y por el número de días en los que se realiza el tratamiento. Es importante considerar que la dosis de gonadotropina varía con el tipo de FSH, según la especie bovina (*Bos taurus* o *Bos indicus*) o la raza (incluso hay variabilidad entre los individuos de una misma raza) de vacas que se estén sometiendo a tratamiento SOV. (Jimenez, 2009).

La vía de administración también es importante ya que se ha observado que la aplicación intramuscular brinda una respuesta superovulatoria significativamente mayor a la aplicación subcutánea (Becaluba, 2007).

Por todo lo expuesto, se deben considerar los reportes y las experiencias previas para determinar cuál es la dosis más adecuada de FSH para un tratamiento de SOV (Jimenez, 2009).

#### **2.9. Importancia del examen clínico previo**

De acuerdo con Becaluba, (2007); es muy importante que previo a la selección de las donantes se practique el examen ginecológico del aparato reproductor, pues a través de este se va a determinar el estado reproductivo de las vacas y se van a detectar alteraciones reproductivas que pudieran alterar los resultados del programa de SOV.

Las vacas posparto se consideran para SOV después de haber finalizado su puerperio y reiniciado la actividad ovárica. Además, se debe realizar la aplicación correcta de las técnicas biotecnológicas (sincronización de celo, IA, SOV y TE), lo cual dependen del conocimiento y la actualización en fisiología reproductiva y farmacología, así como de la experiencia de los profesionales responsables (Becaluba, 2007).



## **2.10. Características de la somatotropina recombinante bovina y su rol en la reproducción**

La somatotropina bovina es una hormona polipeptídica constituida por 191 aminoácidos producida en la adenohipófisis, específicamente de las células acidófilas o somatotrópicas de esta glándula (Colunga y Salgado, 2005).

En numerosos tejidos y órganos que conforman el sistema reproductor de la hembra bovina se han identificado receptores de bST (Rhoads, Meyer, Kolath, Lamberson y Lucy, 2008): células de los ovarios, folículos, cuerpo lúteo, células de la granulosa, oviducto, miometrio, endometrio y placenta, lo que sugiere una acción directa de esta hormona en diferentes aspectos de la fisiología reproductiva. Sin embargo, la mayoría de los receptores son encontrados en el hígado, donde actúa regulando la producción y secreción del factor de crecimiento insulínico (IGF) que también actúa sobre la reproducción (Bragaglia, 2009).

El proceso de foliculogénesis está regulado por mecanismos endocrinos, paracrinos y/o autocrinos. Como mediadores de estos mecanismos participan: las gonadotropinas, la insulina, la hormona de crecimiento y el factor de crecimiento insulínico (IGF-1) (Sirotkin, 2005). El IGF-1 cumple un papel importante en la reproducción de la hembra bovina, y se considera un estimador indirecto de la aptitud del animal para alcanzar la reproducción (Arboleda, Uribe y Osorio, 2011; Kuehner et al., 1993).

Estudios sugieren que la insulina actúa en conjunto con el IGF-1 durante la foliculogénesis estimulando la proliferación de células de la granulosa y su producción de esteroides ya que se detectaron receptores específicos a insulina y la presencia de su ARNm en diferentes tipos de células del ovario (células de la granulosa, tecales, lúteas y del estroma). Además, el aumento de la síntesis de IGF-1 estimula la actividad de la aromatasa incrementando el número de receptores para LH, mediando así las acciones de la hormona de crecimiento sobre la función folicular (Avila y Raymundo, 2000).

El crecimiento y desarrollo folicular ovárico está controlado principalmente por las



gonadotropinas, pero también interviene el IGF-1 en el ovario realizando un mecanismo de amplificación de la acción de gonadotropinas; también actúa en las células de la granulosa estimulando su proliferación, diferenciación y esteroidogénesis y además favorece la liberación de progesterona y oxitocina (Arboleda et al., 2011).

### **2.11. Usos de la Somatotropina Recombinante Bovina**

En 1982 se publicó el primer estudio acerca del uso de la somatotropina recombinante bovina (bST) en vacas lecheras (Bauman, 1999). Esta hormona incrementa la producción de leche a través de un mecanismo homeorrético que consiste en diversas adaptaciones fisiológicas a largo plazo, que permiten a la glándula mamaria disponer de más precursores para la síntesis de leche incrementando la capacidad lactopoyética (Hernandez y Gutierrez, 2013).

Su uso generó mucha discusión por tratarse de una hormona que probablemente las vacas tratadas liberan a través de la leche para consumo humano por lo que en algunos países está prohibido su uso.

Luego de algunos estudios realizados en vacas lecheras se llegó a la conclusión de que la bST puede influenciar la reproducción, pero su uso aún no está generalizado debido a que no hay muchos estudios que comprueben realmente sus beneficios (Bragaglia, 2009). Estimula en el hígado la síntesis del factor de crecimiento insulínico IGF-1 que como ya se mencionó cumple funciones importantes en la reproducción.

### **2.12. Mecanismos de acción mediante los cuales la bST mejora la respuesta superovulatoria**

La tasa de fertilización y la sobrevivencia embrionaria determinan el porcentaje de concepción (Hernández y Gutierrez 2013). El éxito de los tratamientos de superovulación se ha atribuido en parte al número de folículos antrales pequeños y sanos que se encuentran en la donante al iniciarse el tratamiento con gonadotropinas (Becaluba, 2007).



Se ha comprobado que al aplicar la bST antes del inicio del tratamiento de SOV se incrementa el número de folículos antrales sanos que emergen de una onda folicular, lo cual sugiere un aumento en la sensibilidad de la respuesta superovulatoria y un incremento de la tasa de embriones recuperados (Moreira et al., 2002).

Un estudio demostró que aplicando bST antes de IATF la población de folículos antrales de 2 a 5 mm de diámetro aumentó significativamente, lo que sugiere que la bST favorecería la respuesta a los tratamientos de SOV estimulando la folículoogénesis a través del aumento de las concentraciones periféricas del IGF-1 (Gong et al., 1991).

El mecanismo por el cual la bST mejora el porcentaje de concepción está relacionado con los efectos directos e indirectos de la somatotropina en los procesos reproductivos (Hernández y Gutierrez, 2013).

La muerte embrionaria es considerada como una de las principales causas de falla reproductiva que puede deberse en general a factores genéticos y ambientales (Hernandez y Gutierrez, 2013). Se han determinado dos momentos en los cuales ocurren la mayoría de pérdidas embrionarias y es aquí donde la bST y el IGF-1 ejercen su efecto:

El primero, durante la fecundación y los primeros 7 días de desarrollo embrionario. En la fecundación la bST actúa sobre las células del cúmulus o directamente en el ovocito a través de sus receptores (Hernandez y Gutierrez, 2013). Moreira et al., (2002), demostraron que el tratamiento con bST al momento de la inseminación mejora la capacidad de fecundación y el número de embriones transferibles sin afectar el número total de estructuras recuperadas.

Se demostró que durante las primeras etapas de desarrollo, el embrión tiene receptores para la somatotropina e IGF-1 por lo tanto su administración incrementa la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto (Hernandez y Gutierrez, 2013).



El incremento de las tasas de fertilidad en vacas donantes tratadas con bST al momento de la IA se atribuye a cualquiera de los efectos directos o indirectos de la bST mediada a través de una mayor concentración en plasma de IGF-1, por lo tanto, bST o IGF-1 incrementan la capacidad de fertilización del esperma o la competencia para que el ovocito sea fecundado. (Moreira et al. 2002)

Las células del cúmulo y de la granulosa del ovocito expresan ARNm para receptores de bST. El tratamiento con bST estimula la expansión del cúmulo y la maduración nuclear de los ovocitos, y así se incrementa la fertilización basada en el aumento de la división de los ovocitos madurados en presencia de la bST (Moreira, et al., 2002).

Según Hernandez y Gutierrez, (2013), la segunda ventana fisiológica es cuando ocurre el reconocimiento materno de la gestación (16 a 19 días después de la inseminación). Como hay receptores para bST e IGF-1 en las glándulas endometriales, la administración de bST mejora el ambiente uterino favoreciendo el desarrollo embrionario temprano y su capacidad de producir interferón-tao; además se reduce la sensibilidad a los efectos de la  $PGF2\alpha$  y se cree que la bST también podría favorecer la supervivencia embrionaria a través del mejoramiento de la función del cuerpo lúteo que tiene receptores para bST. Una de las causas de muerte embrionaria se relaciona con el retraso del desarrollo embrionario que reduce la capacidad del embrión de producir interferón-t debido a la baja concentración sérica de progesterona (Moreira et al, 2000). Además, se demostró que la bST actúa como un factor de sobrevivencia embrionaria ante factores uterinos embriotóxicos ya que el IGF-1 bloquea la apoptosis causada por toxinas y por estrés calórico (Hernández y Gutierrez, 2013).

### **2.13. Manipulación del tracto reproductor**

Se debe tener mucho cuidado durante el proceso de recuperación de los embriones para no producir daños al tracto reproductor de la donante ya que la manipulación excesiva y el equipo que se utiliza pueden causar daño a los cuernos uterinos o a los oviductos y provocar hemorragias en el útero (Mapletoft y Stookey, 2000).

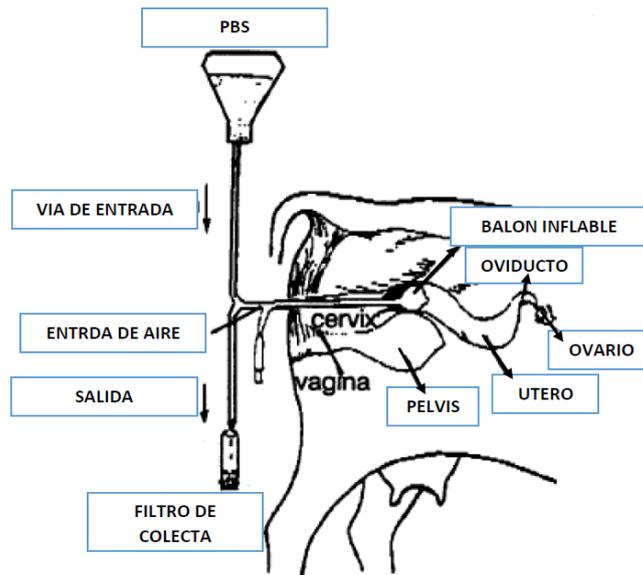


## 2.14. Recolección de los embriones

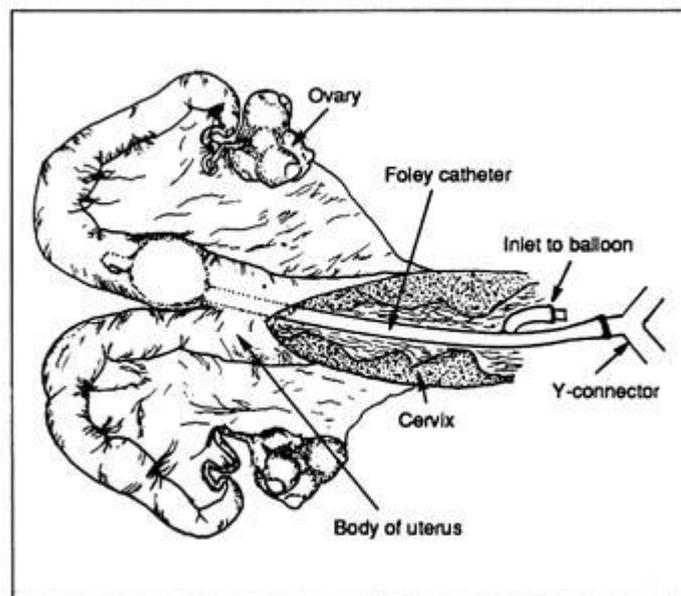
El éxito en esta etapa va a depender de dos factores: el primero es la capacidad de supervivencia de los embriones y mantenerse viables después de ser recuperados del tracto genital, evaluados y transferidos a una receptora con cambios de medio y de temperatura y el otro factor es cómo se realiza la técnica de obtención de los embriones, procurando no poner en riesgo la integridad del tracto genital y garantizando la posibilidad de repetir la técnica las veces que se requiera (Palma, 2008).

Las primeras técnicas usadas hace más de veinte años para la recolección de embriones eran quirúrgicas e implicaban un procedimiento de lavado de los cuernos y oviductos. Esta manipulación provocaba lesiones y adherencias lo cual limitaba la posibilidad de repetir la técnica hasta máximo tres veces por vaca. En la actualidad los embriones pueden ser obtenidos del útero mediante métodos no quirúrgicos luego de un tratamiento de SOV. Esta técnica de recolección y el instrumental que se utiliza, han facilitado el procedimiento que involucra la colocación de una sonda a través del cérvix por la cual se introduce y extrae una solución de lavado y se disminuye el trauma uterino (Palma, 2008).

Existen varios métodos de recolección de embriones mediante el uso de sondas y circuitos de recolección, las diferencias entre ellos, así como las ventajas y desventajas observadas, son determinadas por la experiencia del operador, medios e infraestructura disponible, pero el factor determinante para obtener mejores resultados es la destreza del mismo para recuperar los embriones (Palma, 2008).



**Figura 6. Diagrama del procedimiento de lavado y recuperación del embrión.  
(Selk, 2002)**



**Figura 7. Posición del catéter de Foley para la descarga del cuerno uterino.  
(Seidel y Seidel, 1991.)**

Uno de los más utilizados es el método de circuito cerrado con flujo discontinuo (Palma, Alberio y Brem, 1991). Es un procedimiento relativamente simple que se puede completar en 30 minutos o menos sin afectar a la vaca (Argudo, 2016). En síntesis, se coloca un mandril pre-esterilizado en el interior de una sonda Foley para que esté rígida y facilite traspasar el cuello uterino. Una vez que la punta de la sonda



alcanza el tercio medio a 5cm craneal del ligamento intercornual de cada cuerno uterino, se procede a insuflar el balón con 8 a 12 ml de aire dependiendo del grosor del mismo. A través de la segunda vía de la sonda Foley, que está conectada a un catéter (en forma de Y), cada una provista de un clamp plástico para controlar el flujo de entrada y salida, se procede a introducir cierto volumen de una solución salina buffer fosfato (PBS) (Figura 6). Luego de masajear la mitad anterior del cuerno uterino, la solución es drenada a través de un filtro de malla metálica con poros entre 60 a 90  $\mu\text{m}$  de diámetro en donde quedan retenidos los embriones en un pequeño volumen de PBS. (Selk, 2002; Argudo, 2016). Este procedimiento se repite en ambos cuernos uterinos de cada vaca tratada, utilizándose un volumen de 500 ml de PBS por cuerno. Según Mapletoft y Stookey, (2000) debe controlarse y medirse el volumen de medio infundido y recuperado como una medida de la eficiencia del procedimiento en la recuperación de embriones. Una vez terminado este proceso, cada filtro es llevado a un ambiente cerrado y acondicionado para tal fin, en donde se evalúan las estructuras recuperadas en un estereoscopio de luz diascópica, y se clasifican de acuerdo a las pautas establecidas por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS).

#### **2.14.1. Medios a utilizar**

Según Mapletoft y Stookey, (2000), los medios de recogida, mantenimiento, cultivo y congelación de embriones deben ser de alta calidad y preparados con agua de altísima calidad. Se debe controlar y medir el volumen de medio infundido y recuperado y los filtros deben manipularse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **2.14.2. Manipulación de los embriones**

No se debe dejar los embriones en el medio en donde se los recolecta por mucho tiempo ya que puede haber sustancias resultantes del lavado uterino que inhiben el desarrollo embrionario. Se debe evitar la exposición directa de los embriones a la luz solar o artificial, además se debe manipular los embriones de cada donante con su respectivo instrumental para prevenir contaminación. (Mapletoft y Stookey, 2000).



### 2.14.3. Evaluación y clasificación de los embriones

Se ha determinado un método de evaluación y clasificación de los embriones considerando dos aspectos fundamentales en los que está basada la clasificación de la IETS que son: estado de desarrollo y calidad del embrión (Argudo, 2016). Para determinar el estado de desarrollo de un embrión se toma en cuenta el tiempo desde que fue fecundado hasta que empezó su división (Figura 7) y se clasifican en: No Fecundado (2 a 12 células), Mórula Temprana, Mórula, Blastocisto Temprano, Blastocisto, Blastocisto Expandido, Blastocisto Eclosionado, Blastocisto Eclosionado Expandido, ovocitos sin fecundar, embriones degenerados o muertos y embriones transferibles. A su vez, de acuerdo a numerosos criterios como la forma y tamaño del embrión, simetría y compactación de las blastómeras, color y textura del citoplasma, uniformidad de la zona pelúcida, los embriones fueron clasificados en calidad 1 (excelente o bueno); calidad 2 (regular); calidad 3 (malo) y calidad 4 (muerto o degenerado) (Argudo, 2016).

No hay aparentemente ninguna diferencia en las tasas de preñez al transferir embriones en diferentes etapas de desarrollo asumiendo que se transfieren a la hembra receptora en el momento apropiado del ciclo estral. Los embriones de estadio 4, 5 y 6 soportan bien los procedimientos de congelación y descongelación. La calidad del embrión es también de suma importancia para asegurar la supervivencia al estrés de congelación y descongelación. Los embriones de grado 1 generalmente se consideran los únicos que se congelan. Los embriones de grado 2 pueden ser congelados y descongelados, sin embargo, las tasas de preñez se reducen. (Selk, 2002).

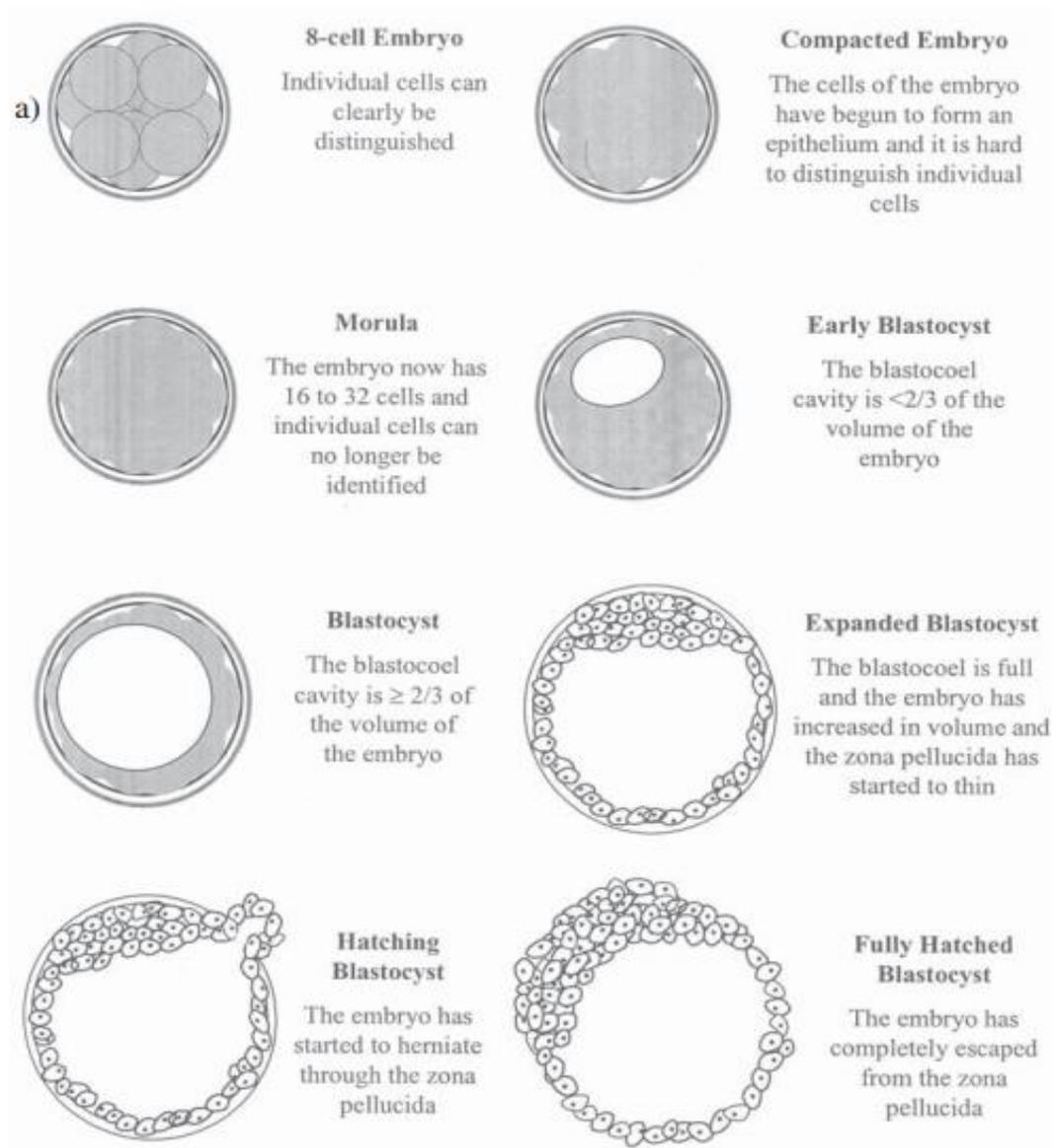
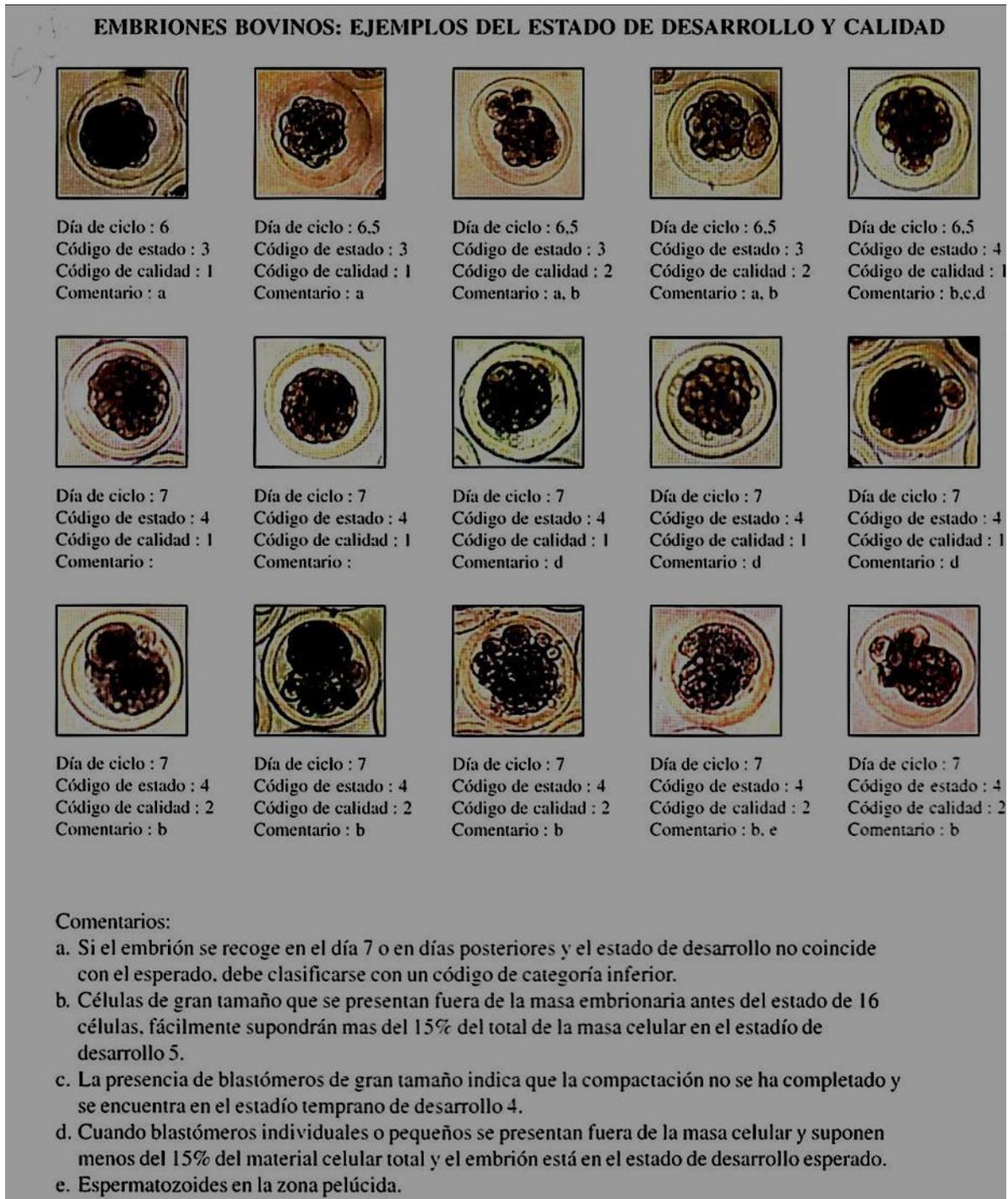


Figura 8. Esquema del desarrollo embrionario (Gardner y Watson, 2004).



**Figura 9: Embriones Bovinos: Ejemplos del Estado de Desarrollo y Calidad (Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, 2000.)**



## CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Materiales.

#### 3.1.1. Materiales Biológicos.

40 Vacas mestizas.

#### 3.1.2. Materiales Físicos.

Fármacos para SOV:

Hormona folículo estimulante (Folltropin®-V; Bioniche Animal Health Inc., Belleville, Ontario, Canadá), implantes de progesterona (1,3 g; CIDR®, Zoetis, Ecuador), Benzoato de estradiol, progesterona, prostaglandina F2 $\alpha$  (D-cloprostenol) y bST (500 mg; Lactotropina®, Elanco Salud Animal, México).

Fármacos para la colecta de embriones:

Anestésico (lidocaína), xilaxina, PBS (Solución Alcalina Buffer Fosfato) y prostaglandina F2 $\alpha$  (D-cloprostenol).

Materiales y equipo de laboratorio:

Placa térmica, estereoscopio, computadora, congelador de embriones, termo, nitrógeno, Holding, etilenglicol, jeringuilla de 2 piezas, jeringuillas de 5cc, agujas, micropipetas, puntas de pipeta, caja Petri de búsqueda, caja Petri de 2 y 4 pocillos, pajuelas, tapones, marcadores y papel toalla.

#### 3.1.3. Materiales de Campo.

Ecógrafo marca Aloka (ProSound SSD-500), tubo en y, sonda Folley, Filtro para embriones, jeringuilla de aire, jeringuilla de 5cc, guantes de examinación e inseminación, botas y overall.



### **3.2. Ubicación y características de las unidades de producción**

La investigación se llevó a cabo en cuatro haciendas ubicadas en los cantones de Machala y Santa Rosa en la Provincia del Oro, y en las parroquias Tarqui y Cumbe del cantón Cuenca, provincia del Azuay.

Se seleccionaron hatos con características similares de manejo, cuya alimentación estaba basada: para los animales de la Costa en pastoreo en potreros de pasto Saboya (*Panicum Maximum*), Taner (*Brachiaria arrecta*) o mezclas de brachiarias (*Brachiaria brizanta*, *Brachiaria humidicola*, etc), en la suplementación mineral ad libitum, y en el suministro de 1 a 2 kg de alimento balanceado al día según el nivel de producción láctea. Y para los animales de Tarqui y Cumbe su alimentación estaba basada en pastoreo de mezcla forrajera constituida por Ray grass tetraploide perenne y anual y trébol blanco; y la suplementación igual que para los animales de la Costa. El plan sanitario se caracterizó en la prevención de las principales enfermedades que afectan los rebaños bovinos de la región.

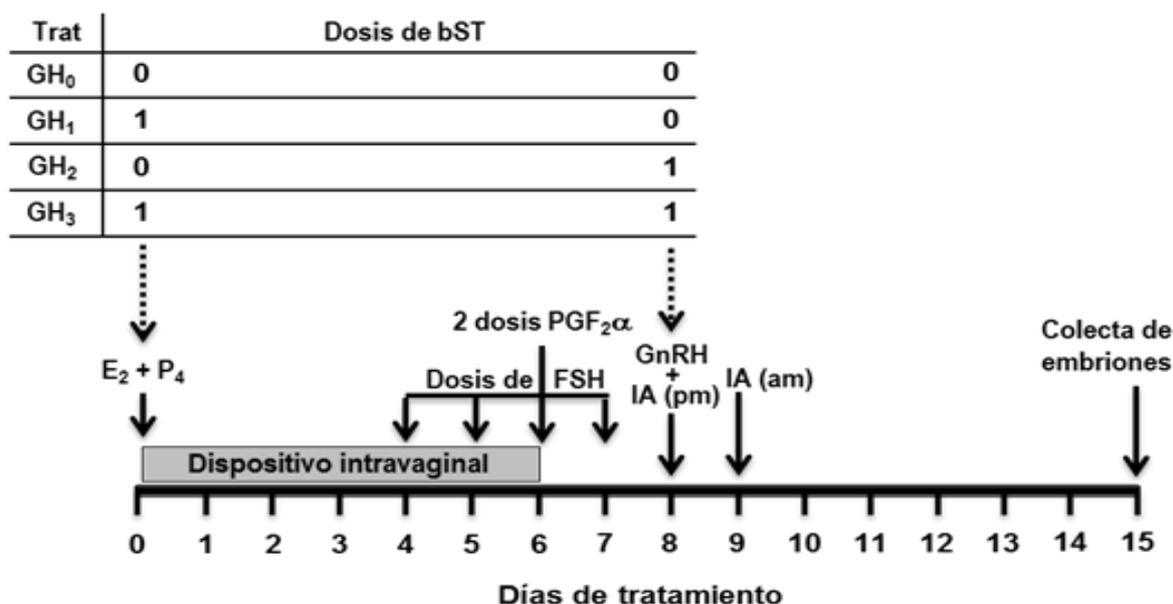
### **3.3. Caracterización de la unidad de análisis**

En el presente estudio se utilizaron 40 vacas mestizas F1 (*Bos Indicus* x *Bos Taurus*) que fueron seleccionadas según las siguientes características: condición corporal de 2,75 a 3 en la escala de 1 a 5 (Edmonson, et al., 1989), con edades comprendidas entre 30 a 60 meses, en buen estado de salud y sin antecedentes de problemas reproductivos. En la evaluación ginecológica se constató que el tracto reproductivo no tuviera ninguna anomalía y que las vacas a incluirse en el estudio estuvieran ciclando, es decir con un cuerpo lúteo en los ovarios.

### **3.4. Tratamiento de superovulación**

Se utilizó un protocolo de sincronización del celo y de la ovulación que consistió en la colocación de un dispositivo intravaginal de liberación lenta de P4 (1,3 g; CIDR®, Zoetis, Ecuador) junto con una dosis intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol y 100 mg de P4 en el día 0 (Figura 8). A partir del día 4 se administraron 280 mg de FSH-P (Folltropin®-V; Bioniche Animal Health Inc., Belleville, Ontario,

Canadá) divididos en 8 aplicaciones decrecientes cada 12 horas de una dosis inicial de 50 mg (50, 40, 30, 20 mg × 2) (Figura 8), tal como lo indica Bó y Mapletoft (2014). En el día 6 se inyectaron dos dosis IM de 150 µg de D-cloprostenol (Laboratorios Calier de los Andes S.A., Bogotá, Colombia) con un intervalo de 12 horas, y se removió el implante con la primera dosis de PGF $\alpha$ . Las vacas fueron inseminadas a las 60 y 72 h luego de la segunda dosis de PGF $\alpha$ . Los embriones fueron colectados mediante el método no quirúrgico a los 7 días de la primera IA (Becaluba, 2007).



**Figura 10. Protocolo de superovulación en vacas mestizas tratadas o no con bST al inicio del tratamiento (día 0) y/o al momento la primera inseminación artificial.**

Previo al inicio del tratamiento de sincronización las vacas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales:

Control (GH0; n=10), sin bST.

Grupo 1 (GH1; n=10), una dosis de bST (500 mg; Lactotropina®, Elanco Salud Animal, México) al momento de colocarse el dispositivo intravaginal.

Grupo 2 (GH2; n=10), una dosis de bST al momento de la primera IA.

Grupo 3 (GH3; n=10), una dosis de bST al colocarse el dispositivo intravaginal y otra al momento de la primera IA.



### **3.5. Evaluación de los cuerpos lúteos**

El día 15 del tratamiento y previo inicio del lavado uterino para la recuperación de embriones, los ovarios de cada vaca fueron monitoreados ecográficamente para determinar el número de cuerpos lúteos y valorar la respuesta al tratamiento superovulatorio. Para tal fin se usó un ecógrafo marca Aloka (ProSound SSD-500), equipado con un transductor lineal de ultrasonido de 7,5 MHz, el cual se introdujo a través del recto para explorar los ovarios y determinar el número de estructuras luteales.

### **3.6. Colecta, evaluación y clasificación de embriones**

Luego de transcurridos 7 días desde la primera IA se realizó la colecta de embriones, mediante el método de circuito cerrado con flujo discontinuo descrito anteriormente.

Se procedió a evaluar y clasificar los embriones de acuerdo a la IETS y en las hojas de campo se registró para cada grupo experimental los siguientes datos: número de cuerpos lúteos observados mediante ecografía, número total de estructuras recuperadas, número de ovocitos sin fecundar, de embriones degenerados o muertos y de embriones transferibles recolectados.

### **3.7. Análisis Estadístico**

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), y para el análisis de datos se usó el software estadístico SPSS versión 23. Para determinar si los datos cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se aplicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente. Una vez demostrados los supuestos antes mencionados los datos correspondientes al número de cuerpos lúteos fueron analizados mediante un ANOVA seguido de un test de Duncan.

Las proporciones de cuerpos lúteos, estructuras obtenidas, embriones transferibles, embriones degenerados y ovocitos sin fertilizar se analizaron mediante el test de Chi-cuadrado.



Para presentar los resultados se usaron medias, desviación estándar y coeficientes de variación. Las variables se consideraron estadísticamente diferentes cuando  $p < 0.05$ .



## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Cuerpos lúteos

La Tabla 1 muestra el número de cuerpos lúteos detectados por ecografía en respuesta al tratamiento superovulatorio. Como se observa, el grupo control (sin bST) fue el tratamiento que indujo el mayor número de cuerpos lúteos con respecto a los demás grupos experimentales. Sin embargo, luego de determinar que los datos no cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas según los test de Kolmogorov-Smirnov y Leven (Anexo 1 y 2) respectivamente, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (Anexo 3) y se determinó que hubo diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos. En contraposición a lo esperado, se aprecia que las vacas que no recibieron bST (GH0) fueron las que produjeron más cuerpos lúteos, aunque la variación de la respuesta también fue mayor que la de los demás grupos experimentales evaluados (La Tabla 1). En tal sentido, mientras que el coeficiente de variación de GH0 fue de 66,5%, el de los demás grupos varió entre 48,5 y 51,1%.

**Tabla 1. Número (media  $\pm$  error estándar) de cuerpos lúteos que resultaron de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas**

Tratamientos	n	Media $\pm$ ES	Coeficiente Variación (%)	Intervalo de confianza 95%	
				Límite Inferior	Límite Superior
<b>GH0 (Control)</b>	10	13,9 $\pm$ 9,2 <sup>a</sup>	66,5	7,3	20,5
<b>GH1</b>	10	8,0 $\pm$ 4,0 <sup>a</sup>	50,1	5,1	10,9
<b>GH2</b>	10	7,1 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	51,1	4,5	9,7
<b>GH3</b>	10	9,0 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	48,5	5,9	12,1
<b>TOTAL</b>	40	9,5 $\pm$ 6,19 <sup>a</sup>	65,1	7,5	11,5

Letras similares en la misma columna no difieren ( $P > 0,05$ ). Las vacas de todos los grupos experimentales recibieron un tratamiento superovulatorio estándar, sin bST (grupo control), con bST al inicio de la P4 (GH1), con bST al momento de la IA (GH2), o con bST al inicio de la P4 y al momento de la IA (GH3).

### 4.2. Estructuras obtenidas

La Tabla 2 indica el número de estructuras recuperadas (embriones y ovocitos) al 7mo día posterior a la 1era IA. Como se puede observar, en el tratamiento GH3, al



cual se aplicó la bST al momento de colocarse el dispositivo intravaginal con P4 y cuando se practicó la 1ra IA, se recuperó mayor cantidad de estructuras. Se comprobó que los datos fueron normales mediante la prueba kolmogorov-Smirnov (Anexo 1), para luego aplicarse un ANOVA (Anexo 4) que determinó que no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre grupos experimentales para ésta variable. En todos los casos el coeficiente de variación fue muy alta y oscilo entre 75,8% (GH1) y 40,0% (GH3).

**Tabla 2. Número (media  $\pm$  error estándar) de estructuras obtenidas (ovocitos y embriones) como resultado de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas**

Tratamientos	n	Media $\pm$ ES	Coeficiente Variación (%)	Intervalo de confianza 95%	
				Límite Inferior	Límite Superior
<b>GH0 (Control)</b>	10	8,5 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	63,3	4,4	12,6
<b>GH1</b>	10	9,1 $\pm$ 6,9 <sup>a</sup>	75,8	4,1	14,0
<b>GH2</b>	10	9,5 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>	45,0	6,4	12,6
<b>GH3</b>	10	10,7 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>	40,6	7,6	13,8
<b>TOTAL</b>	40	9,5 $\pm$ 5,3	55,5	7,7	11,1

Letras similares en la misma columna no difieren ( $P > 0,05$ ). Las vacas de todos los grupos experimentales recibieron un tratamiento superovulatorio estándar, sin bST (grupo control), con bST al inicio de la P4 (GH1), con bST al momento de la IA (GH2), o con bST al inicio de la P4 y al momento de la IA (GH3).

### 4.3. Embriones transferibles

Como se indica en la Tabla 3, el tratamiento GH3 produjo mayor número de embriones trasferibles comparado con los tratamientos GH1, GH2 y el control, aunque las diferencias no fueron significativas ( $P > 0,05$ ). Esto fue determinado con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Anexo 3) ya que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Anexo 1).



**Tabla 3. Número (media  $\pm$  error estándar) de embriones transferibles obtenidos como resultado de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas**

Tratamientos	n	Media $\pm$ ES	Coeficiente Variación (%)	Intervalo de confianza 95%	
				Límite Inferior	Límite Superior
<b>GH0 (Control)</b>	10	6,3 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	77,0	2,8	9,8
<b>GH1</b>	10	7,3 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	88,5	2,6	11,9
<b>GH2</b>	10	7,3 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	48,7	4,7	9,8
<b>GH3</b>	10	8,1 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	44,4	5,3	10,9
<b>TOTAL</b>	40	7,25 $\pm$ 4,7	64,6	5,7	8,7

Letras similares en la misma columna no difieren ( $P > 0,05$ ). Las vacas de todos los grupos experimentales recibieron un tratamiento superovulatorio estándar, sin bST (grupo control), con bST al inicio de la P4 (GH1), con bST al momento de la IA (GH2), o con bST al inicio de la P4 y al momento de la IA (GH3).

#### 4.4. Embriones degenerados

El número de embriones degenerados varió entre 0,3 y 1,1 en los diferentes tratamientos, sin embargo, una vez realizado el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos; para obtener este resultado se aplicó el estadístico de Kruskal-Wallis (Anexo 3) ya que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad según el test de Kolmogorov-Smirnov (Anexo 1).

#### 4.5. Ovocitos sin fertilizar

Se comprobó que los cuatro tratamientos produjeron similares cantidades de ovocitos sin fertilizar (Tabla 4), que fueron estadísticamente similares ( $P > 0,05$ ). Esto fue comprobado por la prueba de Kruskal-Wallis (Anexo 3) ya que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad según el test de Kolmogorov-Smirnov (Anexo 1). Como se observa en la Tabla 4, el número de ovocitos sin fertilizar en los cuatro tratamientos osciló entre 1,2 y 1,5 aunque los grupos GH0 y GH1 fueron los que experimentaron mayor variación.



**Tabla 4. Número (media  $\pm$  error estándar) de ovocitos sin fertilizar resultantes de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas**

Tratamientos	n	Media $\pm$ ES	Coeficiente Variación (%)	Intervalo de confianza 95%	
				Límite Inferior	Límite Superior
<b>GH0 (Control)</b>	10	1,5 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	148,0	0,00	3,1
<b>GH1</b>	10	1,5 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	100,6	0,42	2,6
<b>GH2</b>	10	1,2 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	95,0	0,38	2,0
<b>GH3</b>	10	1,5 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	64,6	0,80	2,2
<b>TOTAL</b>	40	1,4 $\pm$ 1,5	105,7	0,95	1,9

Letras similares en la misma columna no difieren ( $P > 0,05$ ). Las vacas de todos los grupos experimentales recibieron un tratamiento superovulatorio estándar, sin bST (grupo control), con bST al inicio de la P4 (GH1), con bST al momento de la IA (GH2), o con bST al inicio de la P4 y al momento de la IA (GH3).

#### 4.6. Porcentaje de embriones transferibles

Se realizó el análisis de la cantidad de embriones transferibles que se produjeron en cada tratamiento con respecto a la cantidad de estructuras obtenidas, y se determinó si existían diferencias estadísticas mediante la prueba de Chi-Cuadrado (Anexo 6). En el tratamiento en el que se aplicó la bST al inicio de la superovulación (GH1) hubo un 80,2% de embriones transferibles siendo superior a los tratamientos GH2, GH3 y Control, sin embargo, no se encontró diferencias estadísticas significativas entre ellos ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 5. Porcentaje de embriones transferibles luego de la aplicación de bST en diferentes momentos del tratamiento superovulatorio en vacas mestizas**

Tratamientos	n	Nro. embriones Recuperados	Embriones transferibles	
			número	porcentaje
<b>GH0 (Control)</b>	10	85	63	74,1 <sup>a</sup>
<b>GH1</b>	10	91	73	80,2 <sup>a</sup>
<b>GH2</b>	10	95	73	76,8 <sup>a</sup>
<b>GH3</b>	10	107	81	75,7 <sup>a</sup>
<b>TOTAL</b>	40	378	290	76,7 <sup>a</sup>

Letras similares en la misma columna no difieren ( $P > 0,05$ ). Las vacas de todos los grupos experimentales recibieron un tratamiento superovulatorio estándar, sin bST (grupo control), con bST al inicio de la P4 (GH1), con bST al momento de la IA (GH2), o con bST al inicio de la P4 y al momento de la IA (GH3).



## CAPITULO V: DISCUSIÓN

El objetivo principal de los tratamientos de superovulación (SOV) en el ganado bovino ha sido maximizar el número de embriones fertilizados y transferibles con una alta probabilidad de producir preñeces que lleguen a término; sin embargo, uno de los inconvenientes de su uso ha sido la amplia variabilidad individual en las respuestas a los tratamientos de SOV y en la calidad de embriones obtenidos, debido a la influencia de numerosos factores ambientales y a aspectos inherentes al animal, como el estatus fisiológico y endocrino al momento de practicarse el tratamiento (Kafi y McGowan, 1997).

Es por ello que durante muchos años se han investigado diferentes protocolos, y usado diversos tipos de hormonas, para mejorar los resultados de estos tratamientos. Una alternativa para lograr una respuesta más efectiva motivó la realización de la presente investigación, en la que se incorporó la hormona somatotropina recombinante bovina (bST) al protocolo de superovulación con el objetivo de mejorar la respuesta superovulatoria y la tasa de recuperación de embriones transferibles como ha sido previamente reseñado (Gong et al., 1993; Herrier, Einspanier, Schams y Niemann, 1994; Gong et al., 1996; Moreira et al., 2002; Lee et al., 2007).

Uno de los aspectos que se evaluó en el estudio fue la relación que existía entre el número de cuerpos lúteos, cuantificados mediante ecografía transrectal previo al lavado uterino para recuperarlos, y el número total de estructuras obtenidas según los grupos experimentales considerados.

Se ha demostrado que las células del cuerpo lúteo bovino poseen receptores para la hormona del crecimiento y para IGF-1 (Rhoads et al., 2008), que de acuerdo a Juengel y Niswender (1999), podrían jugar un importante rol en la síntesis de progesterona. Esto significa que la bST puede actuar directamente en el CL o también su actividad biológica puede ser mediada por IGF-1 que incrementa su concentración folicular y plasmática después de la administración de bST (Gong et al., 1991; Gong et al., 1993; Herrier et al., 1994; Bilby et al., 2006).



La hormona de crecimiento juega un papel importante en la regulación de la secreción de IGF-1 principalmente en el hígado; según Gong et al., (1991), el tratamiento diario de novillas con 25mg de bST aumentó las concentraciones periféricas de IGF-1, factor de crecimiento que también se ha asociado con la proliferación de las células de la granulosa (Walters et al., 2006), luteinización y posterior soporte de la función luteal (Niswender et al., 2000).

Según Hernández y Zarco (1998), la función lútea anormal se asocia con la muerte embrionaria temprana por lo que se ha investigado la manipulación de la función del cuerpo lúteo con la finalidad de incrementar la secreción de progesterona con el objetivo de mejorar el ambiente uterino, y así favorecer el desarrollo embrionario. Según estos autores, el uso de bST estimuló la secreción de progesterona por el CL. Así, las vacas que recibieron bST durante los primeros 10 días del ciclo estral tuvieron una concentración de progesterona significativamente mayor a la de las vacas no tratadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se encontraron diferencias numéricas en los grupos tratados con respecto al número de cuerpos lúteos observados mediante la ecografía. Contrariamente a lo que se esperaba, el grupo control (GH0), al cual no se le aplicó bST, tuvo alrededor de 5 o más cuerpos lúteos que los demás grupos experimentales, seguido de GH3 que recibió doble dosis de bST, aunque las diferencias entre grupos experimentales no fueron significativas. Esto indica que la aplicación de una o dos dosis de bST durante el tratamiento superovulatorio no incrementó el número de CL en los ovarios de las vacas tratadas.

Similarmente, la aplicación de dos dosis de bST, la 1era al momento del estro y la 2da 10 días más tarde, en vacas repetidoras de servicio fue efectiva para incrementar la tasa de concepción en alrededor de 12 puntos porcentuales con respecto al grupo control (sin bST) (Morales-Roura, Hernández y Rodríguez, 2001).

En lo que respecta al número total de estructuras obtenidas luego de realizada la colecta de embriones, se pudo observar que se recuperó un número mayor de ovocitos y embriones en GH3, grupo que recibió dos dosis de bST, aunque esta



diferencia fue apenas de dos estructuras con respecto al grupo control y menos de dos comparado con los grupos GH1 y GH2.

No obstante, aunque no hubo diferencia estadística entre tratamientos, debido probablemente a la gran variación de la respuesta superovulatoria entre animales del mismo grupo experimental, como ha sido previamente señalado (Kafi y McGowan, 1997), así como también por el número reducido de animales por tratamiento, llama la atención que en todas las variables estudiadas las vacas que recibieron dos dosis de bST (GH3) o una dosis de la droga al momento de la 1era IA (GH2), conformaron los grupos cuya respuesta fue más homogénea, ya que el coeficiente de variación fue consistentemente menor en ellos que en los tratamientos GH0 y GH1.

Según Garzón et al., (2007), el incremento en la respuesta ovulatoria y la tasa de embriones obtenidos con el uso de la bST depende del momento óptimo de la aplicación de la hormona en los protocolos de SOV utilizados. En un estudio se determinó que los resultados obtenidos al aplicar bST y FSH al mismo tiempo son poco relevantes, pero cuando la bST es aplicada previa al inicio del tratamiento con gonadotropinas los resultados mejoraron significativamente.

En un estudio sobre el uso de la bST y su acción sobre el IGF-1 se observó que la bST disminuyó el número de estructuras no fertilizadas y mejoró la tasa de supervivencia embrionaria y estimuló además el desarrollo embrionario, esto gracias a que los animales tratados con bST presentan ovocitos de mejor calidad lo que se traduce en un incremento en la tasa de producción de embriones (Moreira et al., 2002; Bragaglia, 2009).

De acuerdo a los resultados de este estudio, aunque se recuperaron más embriones en el grupo GH3 con respecto a los demás grupos experimentales (107 versus 95, 91 y 85 embriones para GH2, GH1 y GH0 respectivamente), el porcentaje de embriones transferibles en GH3 fue levemente inferior al de los tratamientos en los cuales se administró una dosis de bST al principio del protocolo de sincronización (GH1) o al momento de la 1era IA (GH1).



En un estudio de los efectos del uso de la bST se observó que en las donantes tratadas con bST el número de ovocitos sin fecundar fue reducido comparado con el grupo control de donantes sin bST. Además, el porcentaje de embriones transferibles en relación con el número total de ovocitos y embriones recuperados fue mayor para las donantes tratadas con bST que para el grupo control (sin bST). Si bien es cierto que el número de embriones identificados como mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido no se vio afectado por el tratamiento, el número de blastocistos se incrementó en las donantes tratadas con bST en comparación con el grupo control (Moreira et al., 2002).

En otra investigación hecha por Gong et al., (1991), se estudió el efecto de la aplicación diaria de bST sobre la función ovárica y se demostró que los animales que recibieron el tratamiento con bST tenían significativamente más folículos antrales de 2 a 5 mm de diámetro que los que no recibieron bST. Esto sugiere que el tratamiento con bST alteró el patrón de crecimiento folicular del ovario, lo cual significaría que la aplicación de esta hormona al inicio del tratamiento SOV con gonadotropinas podría favorecer el crecimiento de folículos y mejorar la respuesta superovulatoria.

Garzón et al., (2007) comprobaron que los protocolos donde se utilizó la bST, si bien no aumentan significativamente el número de embriones obtenidos se obtiene una menor proporción de ovocitos no fecundados y estructuras degeneradas y un mayor número de embriones transferibles, estas consideraciones comparadas con los resultados obtenidos en cuanto a ovocitos sin fecundar y estructuras degeneradas en el presente estudio demuestran que la aplicación de bST sobre todo aplicada al inicio del tratamiento de SOV disminuye el número de ovocitos sin fecundar (Moreira et al., 2002), ya que está demostrado que la bST tiene un papel estimulante en la foliculogénesis en ganado (Gong et al., 1991).

Según Jimenez, (2007), la calidad del semen es un aspecto muy importante, pues si en los resultados de una colecta de embriones se obtiene solo ovocitos o embriones de mala calidad, este resultado puede deberse a la calidad del semen y no solo a la respuesta superovulatoria por parte de la donante.



## CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

La administración de bST al inicio del tratamiento de sincronización del celo y/o al momento de la primera inseminación artificial no mejoró la respuesta ovularia ni la producción de embriones transferibles.

Contrariamente a lo esperado, las vacas que no recibieron bST (control) tuvieron entre 35 y 49% más cuerpos lúteos, en respuesta al tratamiento superovulatorio, que las vacas de los demás grupos experimentales. Sin embargo, no se encontró relación entre el número de cuerpos lúteos observados y el número de estructuras obtenidas.

El número de estructuras, ovocitos sin fecundar y embriones degenerados obtenidos tampoco difirieron entre tratamientos.

En la mayoría de los casos, el coeficiente de variación fue considerablemente menor en los grupos GH3 y GH2 que en GH1 y GH0, indicando que en la administración de bST al momento de la inseminación artificial produjo una respuesta menos variable entre las vacas tratadas.

### 6.2. Recomendaciones

Al iniciar trabajos de investigación de esta naturaleza se debe tomar muy en cuenta: la condición corporal, estatus sanitario, días de lactancia, antecedentes reproductivos, para reducir la variabilidad en la repuesta.

Debido a la amplia variación de la respuesta superovulatoria obtenida en investigaciones similares se recomienda realizar estudios incluyendo un número considerablemente mayor de animales por tratamiento.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arboleda, J. L. R., Uribe-Velásquez, L. F., y Osorio, J. H. (2011). Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. *Vet. zootec*, 5(2), 68-81.
- Argudo Garzón, D. E. (2016). Ajuste del tiempo de inseminación con semen sexado en vacas superovuladas (tesis de maestría). Universidad de Cuenca. Cuenca. Ecuador.
- Ávila, V., y Raymundo, H. (2000). Efecto de la administración de somatotropina bovina o precursores gluconeogénicos durante estadios tempranos y/o terminales de la foliculogénesis sobre la respuesta superovulatoria en bovinos/Héctor Raymundo Vera Ávila (No. 636.2089 V4E3).
- Baruselli, P. S., De Sá Filho, M. F., Martins, C. M., Nasser, L. F., Nogueira, M. F., Barros, C. M., y Bó, G. A. (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65(1), 77-88.
- Bauman, D. E. (1999). Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domestic animal endocrinology*, 17(2), 101-116.
- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación en bovinos. Sitio en [Internet]. Disponible en [[http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/17-superovulacion.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf)]. [fecha de acceso 18/03/17].
- Bello, D. M. (2008). Situación actual de la transferencia embrionaria. Revisión y actualización. *Frisona española*, 28(164), 74-80.
- Betteridge, K. J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal reproduction science*, 79(3), 203-244.
- Bilby, T.R., Sozzi, A., Lopez, M.M., Silvestre, F.T., Ealy, A.D., Staples, C.R., y Thatcher W. W. (2006). Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and growth hormone-insulin-like growth factor system responses. *J Dairy Sci.*, 89(9), 3360-3374.
- Blondin, P. (2015). Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction*, 12(3), 356-358.



- Bó, G. A., y Mapletoft, R. J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38-48.
- Bo, G. A., Baruselli, P. S., y Chesta, P. (2006). Dinámica folicular, momento de la ovulación e inseminación artificial a tiempo fijo en donantes de embriones. Jornadas de actualización en biotecnologías de la reproducción en bovinos (IRAC); Córdoba, Argentina.
- Bó, G. A., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R. J., y Tríbulo, H. E. (2006). Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. Educación Continua. UNCPBA.
- Bó, G. A., Pelizzari, M., Bernal, B., Tribulo, A., Ongarato, F., Rodriguez, P., ... y Mapletoft, R. J. (s.f) Atualidades das técnicas de superovulação e transferência de embriões.
- Bragaglia, G. N. (2009). O uso da somatotropina bovina recombinante em reprodução bovina.
- Colazo, M. G., y Mapletoft, R. J. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*, 9(1), 20-37.
- Colunga, A. M., y Salgado, J. R. H. (2005). Efecto de la somatotropina bovina sobre el crecimiento en cabritos saanen. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*, 4, 85-91.
- Driancourt, M. A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211-1239.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., y Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1), 68-78.
- Gardner, D. K., Lane, M., y Watson, A. J. (2004). A laboratory guide to the mammalian embryo. Oxford University Press.
- Garzón, N., Urrego, R., y Giraldo, C. A. (2007). Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos.
- Gong, J. G., Bramley, T., & Webb, R. (1991). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biology of Reproduction*, 45(6), 941-949.



- Gong, J.G., Bramley, T.A., Wilmut, I., y Webb, R. (1993). Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol Reprod.*, 48(5), 1141-1149.
- Gong, J.G.; Wilmut, I.; Bramley T.A. y Webb R. (1996). Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 45:611-622.
- Gutiérrez, J.C. (2008). Hormonas de la reproducción bovina. En: González S., C.; Madrid B., N., Soto B., E. (eds). *Desarrollo Sostenible de la Ganadería Doble Propósito*. Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela. Cap. XLII: 515-530.
- Hernández-Cerón, J., y Gutierrez-Aguilar, C. G. (2013). La somatotropina bovina recombinante y la reproducción en bovinos, ovinos y caprinos. *Agrociencia*, 47(1), 35-45.
- Hernández, C. J., y Zarco, Q. L. A. (1998). Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. *Ciencia veterinaria. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México, DF*, 8, 1-28.
- Herrier, A., Einspanier, R., Schams, D., y Niemann, H. (1994). Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology*, 41(3), 601-611.
- International Embryo Transfer Society (IETS). 2000. *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones*. Versión en castellano. Savoy, IL, USA. pp 185.
- Jimenez, Escobar, C. (2009) Superovulación: Estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56 (3), 195-214.
- Juengel, J.L., y Niswender, G.D. (1999). Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 54, 193-205.
- Kafi, M., y McGowan, M. R. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal reproduction science*, 48(2-4), 137-157.



- Kanitz, W., Becker, F., Schneider, F., Kanitz, E., Leiding, C., Nohner, H.P., y Pöhland, R. (2002). Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev.*, 42(6), 587-99.
- Kuehner, L. F., Rieger, D., Walton, J. S., Zhao, X., y Johnson, W. H. (1993). The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, 40(5), 1003-1013.
- Lee, H.J., Hwang, S., y Yoon J.T. (2007). Effects of bovine somatotropin (bST) administration combined with controlled internal drug release (CIDR) on embryo quality and pregnancy of Hanwoo (Korean native beef cattle) during commercial embryo transfer program. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 20(2), 194-199.
- Mapletoft R., y Stookey J. (2000). Procedimientos sanitarios generales y consideraciones sobre el bienestar asociadas con la producción in vivo de embriones. *Manual de la I.E.T.S. Tercera Edición.* 57-69.
- Mapletoft, R. J., Bó, G. A., y Baruselli, P. S. (2009). Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. *Animal Reproduction*, 6(1), 114-124.
- Mapletoft R., Tribulo A., y Bó G. (2011). Evolución de los protocolos de superovulación en bovinos. *Memorias IX Simposio Internacional de Reproducción Animal- IRAC:* 1-15.
- Morales-Roura, J.S., Zarco, L., Hernández-Cerón, J., y Rodríguez, G. (2001). Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology*, 55(9), 1831-41.
- Moreira, F., Badinga, L., Burnley, C., y Thatcher, W. W. (2002). Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, 57(4), 1371-1387.
- Moreira, F., Paula-Lopes, F. F., Hansen, P. J., Badinga, L., y Thatcher, W. W. (2002). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on



- development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*, 57(2), 895-907.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., y McIntush, E.W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.*, 80(1), 1-29.
- Palma, G., Alberio, R., y Brem, G. (1991). Moderne Reproduktionstechniken in der extensiven. Tierhaltung in Argentinien In Brem G. (ed) Fortschritte in der Tierzucht Ulmer Verlag. 381-409.
- Palma, G. (2008). Biotecnología de la reproducción. Ciencia, tecnología y sociedad. Biotecnología de la Reproducción [http://www. reprobiotec. com/libro\\_verde/cap\\_01. pdf](http://www.reprobiotec.com/libro_verde/cap_01.pdf).
- Palma, G. A. (2008). Recolección de los embriones bovinos. Biotecnología de la Reproducción. Reprobiotec, Segunda Edición. Pp, 109-124.
- Rhoads, M.L., Meyer, J.P., Kolath, S.J., Lamberson, W.R., y Lucy M.C. (2008). Growth hormone receptor, insulin-like growth factor (IGF)-1, and IGF-binding protein-2 expression in the reproductive tissues of early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 91, 1802-1813.
- Rieger, D., Walton, J. S., Goodwin, M. L., y Johnson, W. H. (1991). The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, 35(5), 863-868.
- Rippe, C. A. (2009). El ciclo estral. In 2009 Dairy Cattle Reproduction Conference. Minneapolis, MN (pp. 111-117).
- Rivera, F., Narciso, C., Oliveira, R., Cerri, R. L. A., Correa-Calderón, A., Chebel, R. C., y Santos, J. E. P. (2010). Effect of bovine somatotropin (500mg) administered at ten-day intervals on ovulatory responses, expression of estrus, and fertility in dairy cows. *Journal of dairy science*, 93(4), 1500-1510.
- Seidel, G. E., y Seidel, S. M. (1991). Training manual for embryo transfer in cattle (Vol. 77). FAO.
- Selk, G. (2002). Embryo transfer in cattle. Oklahoma, Oklahoma State University.



- Sirotkin, A. V. (2005). Control of reproductive processes by growth hormone: extra- and intracellular mechanisms. *The Veterinary Journal*, 170(3), 307-317.  
[tecnica/transplante\\_embrionario/17.pdf](#)
- Walters, K.A., Binnie, J.P., Campbell, B.K., Armstrong, D.G., y Telfer, E.E. (2006) The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction*, 131(3), 515-23.

## ANEXOS

### Anexo 1.- Pruebas de Normalidad de datos KOLMOGOROV-SMIRNOV

Pruebas de normalidad

Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Cuerpos Lúteos	GH0 (Control)	,181	10	,200*	,885	10	,150
	GH1	,203	10	,200*	,879	10	,128
	GH2	,211	10	,200*	,933	10	,483
	GH3	,124	10	,200*	,978	10	,956
Embriones Transferibles	GH0 (Control)	,243	10	,096	,862	10	,081
	GH1	,295	10	,014	,850	10	,058
	GH2	,177	10	,200*	,873	10	,108
	GH3	,113	10	,200*	,957	10	,755
Embriones Degenerados	GH0 (Control)	,312	10	,007	,622	10	,000
	GH1	,472	10	,000	,532	10	,000
	GH2	,273	10	,033	,785	10	,010
	GH3	,276	10	,030	,794	10	,012
Ovocitos	GH0 (Control)	,289	10	,018	,725	10	,002
	GH1	,240	10	,108	,865	10	,087
	GH2	,259	10	,055	,825	10	,029
	GH3	,297	10	,013	,868	10	,095
Total de Estructuras	GH0 (Control)	,235	10	,126	,798	10	,014
	GH1	,173	10	,200*	,918	10	,337
	GH2	,236	10	,123	,824	10	,028
	GH3	,164	10	,200*	,907	10	,260

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Anexo 2.- Prueba de Homogeneidad de las Varianzas

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Cuerpos Lúteos	3,044	3	36	,041
Embriones Transferibles	1,817	3	36	,161
Embriones Degenerados	1,404	3	36	,257
Ovocitos	2,410	3	36	,083



### Anexo 3.- Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

#### Rangos

	Tratamientos	N	Rango promedio
Cuerpos Lúteos	GH0 (Control)	10	26,80
	GH1	10	17,95
	GH2	10	15,70
	GH3	10	21,55
	Total	40	
Embriones Transferibles	GH0 (Control)	10	17,70
	GH1	10	18,20
	GH2	10	22,15
	GH3	10	23,95
	Total	40	
Embriones Degenerados	GH0 (Control)	10	19,95
	GH1	10	16,30
	GH2	10	22,75
	GH3	10	23,00
	Total	40	
Ovocitos	GH0 (Control)	10	18,35
	GH1	10	21,45
	GH2	10	19,60
	GH3	10	22,60
	Total	40	
Total de Estructuras	GH0 (Control)	10	18,25
	GH1	10	18,45
	GH2	10	20,95
	GH3	10	24,35
	Total	40	

#### Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>

	Cuerpos Lúteos	Embriones Transferibles	Embriones Degenerados	Ovocitos	Total de Estructuras
Chi-cuadrado	5,191	2,055	2,762	,858	1,796
gl	3	3	3	3	3
Sig. asintótica	,158	,561	,430	,836	,616

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamientos



#### Anexo 4.- ANOVA para Cuerpos Lúteos, Embriones Transferibles, Embriones Degenerados y Ovocitos sin fertilizar

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Cuerpos Lúteos	Entre grupos	276,200	3	92,067	2,744	,057
	Dentro de grupos	1207,800	36	33,550		
	Total	1484,000	39			
Embriones Transferibles	Entre grupos	16,300	3	5,433	,232	,874
	Dentro de grupos	843,200	36	23,422		
	Total	859,500	39			
Embriones Degenerados	Entre grupos	3,875	3	1,292	,876	,463
	Dentro de grupos	53,100	36	1,475		
	Total	56,975	39			
Ovocitos	Entre grupos	,675	3	,225	,095	,962
	Dentro de grupos	85,100	36	2,364		
	Total	85,775	39			

#### Anexo 5.- Pruebas Post hoc DUNCAN para Cuerpos Lúteos, Embriones Transferibles, Embriones Degenerados y Ovocitos sin fertilizar

##### Cuerpos Lúteos

Duncan<sup>a</sup>

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
GH2	10	7,1000	
GH1	10	8,0000	
GH3	10	9,0000	9,0000
GH0 (Control)	10		13,9000
Sig.		,495	,067

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.



### Embriones Transferibles

Duncan<sup>a</sup>

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
GH0 (Control)	10	6,3000
GH1	10	7,3000
GH2	10	7,3000
GH3	10	8,1000
Sig.		,456

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

### Embriones Degenerados

Duncan<sup>a</sup>

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
GH1	10	,3000
GH0 (Control)	10	,7000
GH2	10	1,0000
GH3	10	1,1000
Sig.		,188

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.



## Ovocitos

Duncan<sup>a</sup>

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
GH2	10	1,2000
GH0 (Control)	10	1,5000
GH1	10	1,5000
GH3	10	1,5000
Sig.		,696

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.



## Anexo 6.- Prueba de Chi-Cuadrado para Embriones Transferibles por tratamiento.

Tabla cruzada Tratamientos\*Embriones

			Embriones		Total
			TRANSFERIBL ES	NO TRANSFERIBL ES	
Tratamientos	GH0 (Control)	Recuento	63	22	85
		% dentro de Tratamientos	74,1%	25,9%	100,0%
		% dentro de Embriones	21,7%	25,0%	22,5%
		% del total	16,7%	5,8%	22,5%
	GH1	Recuento	73	18	91
		% dentro de Tratamientos	80,2%	19,8%	100,0%
		% dentro de Embriones	25,2%	20,5%	24,1%
		% del total	19,3%	4,8%	24,1%
	GH2	Recuento	73	22	95
		% dentro de Tratamientos	76,8%	23,2%	100,0%
		% dentro de Embriones	25,2%	25,0%	25,1%
		% del total	19,3%	5,8%	25,1%
GH3	Recuento	81	26	107	
	% dentro de Tratamientos	75,7%	24,3%	100,0%	
	% dentro de Embriones	27,9%	29,5%	28,3%	
	% del total	21,4%	6,9%	28,3%	
Total	Recuento	290	88	378	
	% dentro de Tratamientos	76,7%	23,3%	100,0%	
	% dentro de Embriones	100,0%	100,0%	100,0%	
	% del total	76,7%	23,3%	100,0%	

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,009 <sup>a</sup>	3	,799
Razón de verosimilitud	1,025	3	,795
Asociación lineal por lineal	,000	1	,987
N de casos válidos	378		

a. 0 casillas (.0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 19,79.



## Anexo 7.- Cuadro de Estadísticos Descriptivos de cada Tratamiento y Variable

		Descriptivos							
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Cuerpos Lúteos	GH0 (Control)	10	13,9000	9,24302	2,92290	7,2879	20,5121	4,00	35,00
	GH1	10	8,0000	4,05518	1,28236	5,0991	10,9009	4,00	16,00
	GH2	10	7,1000	3,63471	1,14940	4,4999	9,7001	2,00	15,00
	GH3	10	9,0000	4,37163	1,38243	5,8727	12,1273	1,00	16,00
	Total	40	9,5000	6,16857	,97534	7,5272	11,4728	1,00	35,00
Embriones Transferibles	GH0 (Control)	10	6,3000	4,90011	1,54955	2,7947	9,8053	1,00	18,00
	GH1	10	7,3000	6,46443	2,04423	2,6756	11,9244	1,00	21,00
	GH2	10	7,3000	3,56059	1,12596	4,7529	9,8471	4,00	15,00
	GH3	10	8,1000	3,90014	1,23333	5,3100	10,8900	3,00	15,00
	Total	40	7,2500	4,69451	,74227	5,7486	8,7514	1,00	21,00
Embriones Degenerados	GH0 (Control)	10	,7000	1,25167	,39581	-,1954	1,5954	,00	4,00
	GH1	10	,3000	,67495	,21344	-,1828	,7828	,00	2,00
	GH2	10	1,0000	1,33333	,42164	,0462	1,9538	,00	4,00
	GH3	10	1,1000	1,44914	,45826	,0633	2,1367	,00	4,00
	Total	40	,7750	1,20868	,19111	,3884	1,1616	,00	4,00
Ovocitos	GH0 (Control)	10	1,5000	2,22361	,70317	-,0907	3,0907	,00	6,00
	GH1	10	1,5000	1,50923	,47726	,4204	2,5796	,00	4,00
	GH2	10	1,2000	1,13529	,35901	,3879	2,0121	,00	3,00
	GH3	10	1,5000	,97183	,30732	,8048	2,1952	,00	3,00
	Total	40	1,4250	1,48302	,23449	,9507	1,8993	,00	6,00

## Anexo 8.- Fotografías



Preparación de los animales previa a la colecta.



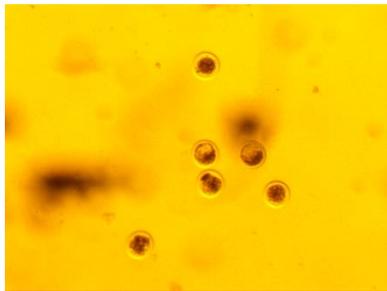
Preparación de los materiales a utilizar en la colecta de embriones.



Lavado y obtención de los embriones.



Laboratorio en campo para la búsqueda y clasificación de los embriones



Embriones obtenidos