



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Influencia del cuerpo lúteo, lugar de depósito del embrión y tiempo de transferencia de embriones congelados-descongelados sobre la tasa de preñez en receptoras Holstein mestizas”

Tesis previa a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista.

Autores:

Carlos Alberto Encalada Neira

CI: 0350102232

carlos.encalada.vet@gmail.com

Milton Paúl Morocho Barrera

CI: 0106116981

milton.pamb1496@gmail.com

Director:

Dr. Luis Eduardo Ayala Guanga PhD.

CI: 0102635463

Cuenca, Ecuador

01-abril-2022

**RESUMEN:**

El presente estudio buscó evaluar el tiempo total utilizado en la transferencia de embriones (TE) congelados-descongelados; tiempo empleado en pasar la cérvix; morfología y funcionalidad (P4) del cuerpo lúteo y lugar de depósito del embrión, sobre el porcentaje de preñez en vaquillas Holstein mestizas. La investigación se realizó en ganaderías ubicadas en las provincias de Azuay y Cañar, zona Austral del Ecuador. Un total de 40 vaquillas fueron seleccionadas como receptoras y recibieron el mismo protocolo de sincronización de estro y de transferencia de embriones (TE). A los 7 días post-estro, las receptoras que presentaron un cuerpo lúteo (CL) recibieron un embrión de calidad excelente (calidad 1). El día de la transferencia se tomaron muestras sanguíneas para su posterior análisis de P4 mediante el Kit de ELISA Bovine Progesterone (Mybiosource Inc.). De acuerdo con el tamaño de CL los animales fueron agrupados en G1 ≤ 17 mm; G2 > 17 y < 20 mm y G3 ≥ 20 mm. Además, los niveles de Progesterona fueron organizados en G1 $\leq 3,7$ ng/ml; G2 $> 3,7$ y $< 4,3$ ng/ml; G3 $\geq 4,3$ ng/ml. El tiempo requerido para pasar la cérvix fue organizado en fácil ≤ 30 s; moderado > 30 y < 60 s; difícil ≥ 60 s. El lugar de depósito del embrión se clasificó en tercio craneal, medio o posterior del cuerno uterino y el tiempo total utilizado para la transferencia del embrión en mínimo ≤ 9 min; moderado > 9 y < 13 min; largo ≥ 13 min. Todas estas variables fueron evaluadas frente al porcentaje de preñez, mediante la prueba Kruskal-Wallis y para determinar correlación se utilizó la prueba de Spearman. Se determinó que vaquillas con un CL más grande presentaron mayor tasa de preñez (G1=0%; G2=47,7% y G3= 80%), con correlación media ($r=0,59$; $p<0,05$); además, animales con niveles mayores de P4 mostraron tasas de preñez más altas (G1=9,1%; G2=47,1% y G3=66,7%), con un valor de correlación media ($r=0,44$; $p<0,05$). Se observó que mientras más complicado fue el paso de la cérvix menos preñez se obtiene (G1=60%; G2=50% y G3=10%) y esto mostró una correlación media ($r=0,36$; $p<0,05$). Por su parte, el lugar de depósito del embrión tuvo tasas de preñez de G1=60%; G2=37,5% y G3=42,1% para el tercio craneal, medio y posterior, respectivamente ($r=0,05$; $p>0,05$). Finalmente, se estableció que cuanto mayor tiempo total fue necesario para la transferencia hubo tasas de preñez menores G1=58,3%; G2=41,2% y G3=27,3% para los grupos mínimo, moderado y largo, respectivamente ($r=0,24$; $p>0,05$). Se concluye que un mayor tamaño de CL, niveles más altos de P4 y un menor tiempo para atravesar la cérvix tuvieron efectos estadísticamente significativos sobre las tasas de preñez, por lo tanto estos factores deben ser considerados por los técnicos dentro de los programas de TE, con el fin de mejorar las tasas de concepción en las ganaderías de nuestra región.

Palabras clave: Cuerpo lúteo. Cérvix. Preñez. Tiempo. Embrión. Transferencia. Progesterona. Ubicación.

**Abstract:**

The aim of the present study sought to evaluate the total time used in the frozen-thawed embryo transfer (TE), cervix transfer score, morphology and functionality (P4) of the corpus luteum and transfer location of embryo, on pregnancy rates in heifers Holstein mestiza. The research was conducted in livestock farms located in the provinces of Azuay and Cañar, Austral area of Ecuador. A total of 40 heifers were selected as recipients and received the same synchronization protocol from estrus and embryo transfer (TE). At 7 days post-estrus, the recipients that presented a corpus luteum (CL) received an embryo of excellent quality (quality 1). On the day of the transfer, blood samples were taken for subsequent analysis of P4 using the Bovine Progesterone ELISA Kit (Mybiosource Inc.). According to the diameter of the CL animals were grouped into G1 \leq 17 mm; G2 $>$ 17 and $<$ 20 mm; G3 \geq 20 mm. Additionally, progesterone levels were organized into G1 \leq 3.7 ng/ml; G2 $>$ 3.7 and $<$ 4.3 ng/ml; G3 \geq 4.3 ng/ml. The cervix transfer score was organized in easy \leq 30 sec; moderate $>$ 30 and $<$ 60 sec; hard \geq 60 sec. The transfer location of embryo was classified into the cranial, middle, or posterior third of the uterine horn and the total time used for embryo transfer into minimum \leq 9 min; moderate $>$ 9 and $<$ 13 min; long \geq 13 min. All these variables were evaluated against the pregnancy rate, by means of the Kruskal-Wallis test and to determine correlation, the Spearman test was used. It was determined that heifers with a larger CL presented a higher pregnancy rate (G1=0%; G2=47.7% and G3=80%), with medium correlation ($r=0.59$; $p<0.05$); in addition, animals with higher levels of P4 showed higher pregnancy rates (G1=9.1%; G2=47.1% and G3=66.7%), with a mean correlation value ($r=0.44$; $p<0.05$). It was observed that the more complicated the passage of the cervix was, the less pregnancy is obtained (G1=60%; G2=50% and G3=10%) and this showed a medium correlation ($r=0.36$; $p<0.05$). For its part, the transfer location of embryo had pregnancy rates of G1=60%; G2=37.5% and G3=42.1% for the cranial, middle, and posterior third, respectively ($r=0.05$; $p>0.05$). Finally, it was established that the longer the total time was necessary for the transfer, the lower the pregnancy rates G1=58.3%; G2=41.2% and G3=27.3% for the minimal, moderate, and long groups, respectively ($r=0.24$; $p>0.05$). In conclusion, a larger diameter of CL, higher levels of P4 and a lower cervix transfer score had statistically significant effects on pregnancy rates, therefore these factors must be considered by technicians within TE programs in order to improve conception rates in livestock farms in our region.

Keywords: Corpus luteum. Cervix. Pregnancy. Time. Embryo. Transfer. Progesterone. Location.



ÍNDICE

ÍNDICE DE ANEXOS	8
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo General	20
2.2 Objetivos Específicos	20
2.3 Preguntas de investigación.....	20
3. REVISIÓN DE LITERATURA	21
3.1 Transferencia de embriones	21
3.1.1 Principales aplicaciones de la TE.....	21
3.2 Manejo de donadoras y receptoras	22
3.2.1 Donadoras	22
3.2.2 Producción de embriones	23
3.2.3 Receptoras.....	23
3.2.4 Diferencias al usar receptoras nulíparas o multíparas	24
3.2.5 Sincronización de las receptoras	25
3.3 Técnica no quirúrgica de transferencia de embriones	25
3.4 Evaluación y manejo de embriones.....	27
3.4.1 Etapa de desarrollo del embrión	27
3.4.2 Calidad del embrión	32
3.4.3 Congelación de embriones	32
3.4.4 Supervivencia de los embriones congelados	33
3.5 Diferencia entre transferencia de embriones frescos y congelados ..	33
3.6 Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones.....	34
3.6.1 Protocolo de sincronización para las receptoras.....	34
3.6.2 Efecto del estro en programas de TE.....	34
3.6.3 Cuerpo Lúteo	35
3.6.4 Lugar de depósito del embrión.....	35
3.6.5 Manipulación del cuerno uterino	36
3.6.6 Diagnóstico de niveles de progesterona (P4)	36



4. MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.1 Materiales.....	38
4.2 Métodos y técnicas empleadas.....	39
4.2.1 Área de estudio.....	39
4.2.2 Procedencia de los embriones congelados.....	40
4.2.3 Receptoras.....	41
4.2.4 Diseño experimental	41
4.3 Metodología	42
4.3.1 Protocolo de la sincronización del estro y de la TE.....	42
4.3.2 Valoración de las características del cuerpo lúteo de la receptora	42
4.3.3 Preparación de la receptora para la transferencia del embrión.....	43
4.3.4 Proceso de preparación de la pajuela para realizar la transferencia .	43
4.3.5 Determinación del tiempo utilizado en pasar la cérvix	43
4.3.6 Ubicación del lugar de depósito del embrión	43
4.3.7 Medición del tiempo total utilizado para la transferencia.....	44
4.3.8 Toma de muestras de sangre para valorar los niveles de progesterona	44
4.3.9 Valoración del porcentaje de gestación en las receptoras	45
4.4 Análisis Estadístico	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1 Resultados generales del porcentaje de gestación obtenido al utilizar	
embriones congelados-descongelados	46
5.2 Evaluación del tamaño del cuerpo lúteo (CL) frente a la tasa de	
preñez.....	46
5.3 Evaluación de los niveles de progesterona (P4) frente a la tasa de	
preñez.....	48
5.3 Tiempo utilizado en pasar la cérvix frente a la tasa de preñez	49
5.4 Lugar de depósito del embrión en el cuerno uterino frente a la tasa de	
preñez.....	51
5.5 Tiempo total de transferencia frente a la tasa de preñez.....	53
6. CONCLUSIONES	55
7. RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS	67



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ovocito sin fecundar (UFO).....	28
Figura 2. Embrión degenerado	28
Figura 3. Mórula	29
Figura 4. Mórula compacta	29
Figura 5. Blastocisto temprano	30
Figura 6. Blastocisto	30
Figura 7. Blastocisto expandido	31
Figura 8. Blastocisto eclosionado	31
Figura 9. Blastocisto eclosionado expandido.....	32
Figura 10. Mapa de la ubicación del área de estudio.....	39
Figura 11. Protocolo de sincronización del estro y día de la transferencia de embriones en vaquillas Holstein mestizas.....	42
Figura 12. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo con el tamaño del CL. Grupo 1 ≤ 17 mm; Grupo 2 > 17 y < 20 mm; Grupo 3 ≥ 20 mm. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,59$; $p < 0,05$	47
Figura 13. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo con la concentración de P4. Grupo 1 ≤ 3,7 ng/ml; Grupo 2 > 3,7 y < 4,3 ng/ml; Grupo 3 ≥ 4,3 ng/ml. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,44$; $p < 0,05$	48
Figura 14. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo al tiempo empleado para pasar la cérvix. Grupo 1 ≤ 30 s; Grupo 2 >30 y < 60 s; Grupo 3 ≥ 60 s. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,36$; $p < 0,05$	49
Figura 15. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo al lugar de depósito del embrión. Grupo 1 = craneal; Grupo 2 = medio; Grupo 3 = posterior. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,05$; $p > 0,05$	51
Figura 16. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo con el tiempo total empleado en realizar la transferencia del embrión. Grupo 1 ≤ 9 min; Grupo 2 > 9 y < 13 min; Grupo 3 ≥ 13 min. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,24$; $p > 0,05$	53



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tasa general de preñez de las receptoras nulíparas Holstein mestizas al utilizar embriones congelados-descongelados de calidad 1.	46
---	----



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha de datos de las receptoras utilizada en la investigación.....	67
Anexo 2. Receptoras seleccionadas para la investigación.....	69
Anexo 3. Prueba del enhebrado a receptoras	69
Anexo 4. Valoración del cuerpo lúteo (CL) mediante ultrasonografía previo a la transferencia de embriones	70
Anexo 5. Proceso de transferencia de embriones	70
Anexo 6. Diagnóstico de gestación al día 35 pos transferencia del embrión	73



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Carlos Alberto Encalada Neira en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "***Influencia del cuerpo lúteo, lugar de depósito del embrión y tiempo de transferencia de embriones congelados-descongelados sobre la tasa de preñez en receptoras Holstein 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, 01 de abril del 2022

Carlos Alberto Encalada Neira

C.I: 0350102232



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Milton Paúl Morocho Barrera en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación ***"Influencia del cuerpo lúteo, lugar de depósito del embrión y tiempo de transferencia de embriones congelados-descongelados sobre la tasa de preñez en receptoras Holstein 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, 01 de abril del 2022

Milton Paúl Morocho Barrera

C.I: 0106116981



Cláusula de Propiedad Intelectual

Carlos Alberto Encalada Neira, autor del trabajo de titulación ***"Influencia del cuerpo lúteo, lugar de depósito del embrión y tiempo de transferencia de embriones congelados-descongelados sobre la tasa de preñez en receptoras Holstein mestizas"***, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 01 de abril del 2022

Carlos Alberto Encalada Neira

C.I: 0350102232



Cláusula de Propiedad Intelectual

Milton Paúl Morocho Barrera, autor del trabajo de titulación ***"Influencia del cuerpo lúteo, lugar de depósito del embrión y tiempo de transferencia de embriones congelados-descongelados sobre la tasa de preñez en receptoras Holstein mestizas"***, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 01 de abril del 2022

Milton Paúl Morocho Barrera

C.I: 0106116981



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por su amor, su bondad, por haberme acompañado en el día a día en el transcurso de mi carrera y por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles permitiéndome seguir adelante.

Un profundo agradecimiento a mis padres Wilson y Rosa, por su afecto, su cariño, sus enseñanzas que han permitido convertirme en una persona de bien, así como por su apoyo incondicional para lograr todo lo que me he propuesto.

Agradezco a mi hermana Paola, por sus consejos, su ayuda y por alentarme en la consecución de mis objetivos.

Finalmente, quiero expresar un agradecimiento especial al Dr. Luis Ayala, docente, tutor y amigo, por sus enseñanzas, su paciencia y su guía en el desarrollo de este trabajo de titulación.

Carlos Encalada

En primer lugar quiero agradecer a Dios y a mis padres por todo el apoyo que me han brindado durante todo este trayecto de mi vida, ya que gracias a ellos he podido cumplir mis metas y sueños.

Agradezco a mi novia y ahora esposa, a mi hija., por haberme apoyado y comprendido en todos los momentos tanto buenos como malos, ya que ellos han sido mi fortaleza para no decaer cuando las situaciones se ponían difíciles.

También quiero dar las gracias a todos y cada uno de los que fueron mis profesores de la U, por transmitir todos sus conocimientos y así llegar a ser un gran Médico Veterinario.

A todos mis amigos, por haber compartido momentos grandiosos e inolvidables.

Milton Morocho



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Wilson y Rosa, quienes han sido los pilares fundamentales de mi vida.

A mi hermana Paola, por ser quién siempre me alienta a ser mejor.

A mi pequeño sobrino Nicolás, a quién quiero mucho y que a través de sus ocurrencias siempre me llena de alegrías.

Carlos Encalada

A mis padres, Manuel y Ecilda.

A mis dos grandes amores, Estefanía y Daniela.

Este logro más que mío es de ellos, y solo desaparecerá el día en el que deje este mundo.

Milton Morocho



ABREVIATURAS UTILIZADAS

TE= Transferencia de embriones

P4= Progesterona

CL= Cuerpo lúteo

PIV= Producción de embriones *in vitro*

IVD= Producción de embriones *in vivo*

IETS= International Embryo Technology Society (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones)

PGF2 α = Prostaglandina F2 α

IA= Inseminación artificial

BE= Benzoato de estradiol



1. INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones en bovinos es una herramienta que se ha empleado ampliamente desde la década de los 70, para mejorar el rendimiento reproductivo y aumentar el número de animales con alto mérito genético dentro de las ganaderías (Hasler, 2014). En el año 2018 se transfirieron un total de 1.129.041 embriones bovinos en todo el mundo, de los cuales 386.133 fueron embriones derivados *in vivo* (IVD) y 742.908 embriones producidos *in vitro* (PIV) (Viana, 2018).

Uno de los factores que ha permitido lograr estos avances en la transferencia de embriones bovinos es la mejora continua alcanzada en la criosupervivencia tanto de los embriones producidos *in vivo* como *in vitro* (Hasler, 2014), a tal punto que, el 60% del total de embriones transferidos anualmente son congelados-descongelados (Dochi, 2019).

A pesar de los avances que han convertido a la transferencia de embriones en un procedimiento rutinario en varias explotaciones ganaderas a nivel mundial (Hansen, 2020), la variación de las tasas de preñez dentro de los programas de transferencia de embriones continúa siendo un problema (Ferraz *et al.*, 2016), ya que se han identificado varios factores que afectan el establecimiento de la gestación (Hasler, 2006), los cuales causan aumento en los costos de aplicación y reducen la posibilidad de que esta técnica pueda extender su uso dentro de las ganaderías, principalmente de los países en desarrollo (Alkan *et al.*, 2020).

Uno de los factores que se ha investigado es la supervivencia embrionaria luego de la criopreservación (Hasler, 2001), llegando a determinar que la tasa de preñez al utilizar embriones congelados-descongelados es 10% más baja que al emplear embriones frescos de la misma calidad (calidad 1 y 2) (Córdova *et al.*, 2015). Esto se aplica tanto para embriones congelados en Glicerol como los criopreservados con Etilenglicol, con resultados que oscilan entre 40 y 50% de efectividad, sin diferencia entre medios de criopreservación (Dochi, 2019).

Sin embargo, hay otros factores que afectan la tasa de preñez en las receptoras como la morfología y funcionalidad del cuerpo lúteo (CL), el grado



de dificultad de atravesar la cérvix, la ubicación del depósito del embrión y tiempo total de transferencia, que si bien han sido valorados, los resultados obtenidos por diversos grupos de investigadores son contradictorios hasta la fecha (Looney *et al.*, 2006; Stroud & Hasler, 2006; Hasler, 2014; Roper *et al.*, 2018).

En cuanto al diámetro del CL, algunos estudios destacan que juega un papel importante en la implantación del embrión debido a la secreción de progesterona (P4), misma que ayuda en el mantenimiento de la gestación del embrión transferido (Oyuela & Jiménez, 2010). De allí que el desarrollo normal del CL permite contar con mayores niveles de P4 de acuerdo a la edad del mismo; por ejemplo, un CL de siete días de vida que mide aproximadamente 15 mm de diámetro llega a producir 1,22 ng/ml de P4 y el mismo CL al día catorce de su ciclo llega a medir 16 mm de diámetro y produce 2,48 ng/ml de P4 (Diuca, 2010).

En este contexto autores como Nogueira *et al.*, (2012); Gonella *et al.*, (2013) y Alkan *et al.*, (2020); determinaron una relación positiva entre el porcentaje de preñez y el tamaño del CL, indicando que a medida que aumenta el diámetro del CL, el porcentaje de preñez se incrementa. Sin embargo, Oshba *et al.*, (2019) y Pérez *et al.*, (2020), al valorar receptoras Holstein y mestizas (*Bos indicus x Bos taurus*) llegaron a establecer que el tamaño del CL no influye en el porcentaje de preñez, ya que la secreción de P4 no se ve afectada por el tamaño del CL, siendo esta importante para el desarrollo del embrión.

Así también, se ha descrito que el tipo de CL (compacto) permite obtener mayor porcentaje de preñez, frente al CL cavitario (Alkan *et al.*, 2020), pero en otros trabajos, como el descrito por Oshba *et al.*, (2019), realizado en vaquillas Holstein determinaron datos contrarios al estudio anterior, llegando a afirmar que se obtienen mayores tasas de preñez en receptoras con CL cavitario (39,39%) frente a cuerpos lúteos compactos (25,42%). Además, de lo descrito, existen incluso trabajos que establecen que la preñez no se ve afectada por el tipo de CL (Nogueira *et al.*, 2012; De Armas *et al.*, 2019).



En lo que respecta al grado de dificultad al que el técnico se enfrenta para pasar el catéter a través de la cervix, hay trabajos como el de Alkan *et al.*, (2020), quienes agruparon a las receptoras de acuerdo al tiempo requerido para pasar la cervix en: grado 1, si se demoraban menos de 60 s, grado 2= entre 60 y 80 s y grado 3= más de 80 s; llegando a determinar que el tiempo no afecta significativamente las tasas de preñez. Pero este estudio difiere con lo establecido por Lopes *et al.*, (2015) y Aguiar *et al.*, (2013). quienes al trabajar con novillas Nelore, si encontraron diferencias estadísticas en el porcentaje de preñez, siendo este mayor cuando las receptoras presentaron una cervix con dificultad grado 1, sin embargo hay que considerar que en estos estudios se incluyó un antiinflamatorio no esterooidal (Meloxicam) para evitar la secreción de Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), lo que supondría explicar la diferencia. Esto conlleva a continuar con la valoración de esta variable para dilucidar si afecta o no el tiempo que se demora en pasar la cervix sobre el porcentaje de preñez.

Por otro lado, al estudiar la influencia del lugar de depósito del embrión dentro del cuerno uterino ipsilateral al CL (tercio craneal, medio o caudal), sobre la tasa de preñez, se ha determinado que ésta es mayor cuando se deposita el embrión en el tercio craneal (Roper *et al.*, 2018); resultados muy similares fueron descritos por Hasler, (2010), quien menciona que se puede obtener un 69 % de preñez cuando se deposita el embrión en el tercio craneal frente al 60 % si se deposita en el tercio inferior. Sin embargo, Ongubo *et al.*, (2015) obtuvieron mejores resultados cuando depositaron el embrión en el tercio medio (48 %) con respecto al tercio craneal (20 %), ellos explican que dicha diferencia se debe a la facilidad de depositar en el tercio medio, ya que si se trata de depositar en el tercio craneal existe mayor manipulación del cuerno uterino, reduciendo el porcentaje de preñez.

Por último, el tiempo total necesario para completar la transferencia y como este influye en el porcentaje de preñez ha sido estudiado por Roper *et al.*, (2018), quienes llegaron a la conclusión de que las tasas de preñez de las receptoras fueron menores cuando se requirieron más de 14 min para la transferencia en comparación con aquellas que se emplearon menos de 9 min para completar la maniobra. Y a nuestro conocer es el único trabajo que valora



este factor, siendo necesario continuar con el estudio de esta variable para fortalecer los resultados.

Por lo tanto, tener una mejor comprensión de estos factores sobre el porcentaje de preñez en receptoras Holstein mestizas nulíparas, permitirá mejorar los resultados hasta ahora obtenidos y fomentar el uso de la transferencia de embriones en nuestra región.



2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo General

Evaluar la influencia del tiempo total de transferencia de embriones congelados-descongelados, incluyendo el tiempo empleado en pasar la cérvix; así como la morfología y funcionalidad (P4) del cuerpo lúteo y el lugar de depósito del embrión, sobre el porcentaje de preñez en vaquillas Holstein mestizas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto del tiempo utilizado en la transferencia del embrión sobre el porcentaje de preñez en receptoras Holstein mestizas.
- Valorar la influencia de la morfología y funcionalidad (P4) del cuerpo lúteo sobre la efectividad de la transferencia del embrión.
- Evaluar si el lugar de depósito del embrión tiene efecto sobre el porcentaje de preñez.

2.3 Preguntas de investigación

- ¿El porcentaje de preñez aumenta cuando el tiempo utilizado para completar la transferencia de embriones es menor?
- ¿A menor dificultad para atravesar la cérvix durante la transferencia mayor es el porcentaje de preñez en las receptoras?
- ¿Los cuerpos lúteos compactos y de mayor tamaño proporcionan niveles superiores de progesterona mejorando el porcentaje de preñez en las receptoras?
- ¿El depósito del embrión en el tercio craneal del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo eleva el porcentaje de preñez en las receptoras?



3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Transferencia de embriones

La transferencia de embriones (TE) en el ganado bovino es una técnica que se ha venido practicando comercialmente en varios países desde hace más de cuatro décadas. Durante este período se han desarrollado y adoptado numerosas tecnologías que incluyen la recuperación y transferencia no quirúrgica de embriones, la sincronización hormonal estrechamente cronometrada de los ciclos estrales de donantes y receptoras, la criopreservación de embriones y la transferencia directa después de la descongelación (Hasler, 2010).

La TE se realizaba casi exclusivamente de forma quirúrgica en los negocios pioneros de TE a principios de la década de 1970. Desafortunadamente, este enfoque suprimió la posibilidad de que las transferencias se realizarán en la granja o en cualquier lugar fuera de una instalación quirúrgica bien equipada (Hasler, 2014). Por lo que, en un estudio realizado por Hasler (2001) se determinó que con embriones frescos la transición de transferencias quirúrgicas a no quirúrgicas no afectó las tasas de preñez tanto en vaquillas como en vacas receptoras.

La TE está ampliamente difundida a nivel mundial, a pesar de que existen notables diferencias entre regiones geográficas, tal y como lo demuestran estadísticas publicadas por la IETS (International Embryo Technology Society), en donde se aprecia que más del 90% de embriones bovinos se transfirieron en Norteamérica, Europa y Sudamérica (Viana, 2018).

3.1.1 Principales aplicaciones de la TE

La principal aplicación de la TE es la proliferación de los denominados fenotipos deseables, puesto que a diferencia de la inseminación artificial que sólo permite la diseminación del potencial genético de los machos, la TE brinda la oportunidad de diseminar el mérito genético tanto de machos como de hembras (Colazo & Mapletoft, 2007).



Por otra parte, es importante mencionar que la TE también puede utilizarse con fines sanitarios, puesto que varios estudios han demostrado que si los embriones mantienen su zona pelúcida intacta y son lavados de acuerdo a las recomendaciones de la IETS, no transmiten enfermedades infecciosas, por lo que la TE podría ser utilizada para salvar el material genético en el caso de brotes de enfermedades así como también para establecer hatos libres de enfermedades (Stringfellow *et al.*, 2004; Wrathall *et al.*, 2004). De esta forma, Baillargeon *et al.* (2001) demostraron que se puede evitar la transmisión vertical de *Neospora caninum*, transfiriendo los embriones obtenidos en donantes seropositivas a receptoras seronegativas.

Además, Baruselli *et al.* (2011) mencionan que la transferencia de embriones permite mejorar la eficiencia reproductiva de las hembras repetidoras y la reducción de los problemas de fertilidad causados por el estrés por calor durante la reproducción y los primeros días de gestación, lo cual a decir de Hansen (2019) y Baruselli *et al.* (2020) se debe al daño que sufre el ovocito y el embrión temprano, pero cuando se transfiere un embrión en la etapa de blastocisto, éste ya ha adquirido resistencia al estrés térmico materno, logrando una gran mejora en las tasas de preñez en climas cálidos.

3.2 Manejo de donadoras y receptoras

La selección y el manejo de las donadoras y receptoras constituyen las actividades más importantes dentro de un programa de transferencia de embriones. De las donadoras, para maximizar la producción de embriones y de las receptoras para tenerlas disponibles en el momento oportuno y con buena fertilidad (García, 2015).

3.2.1 Donadoras

La selección de animales genética o fenotípicamente superiores ha constituido la base de la selección de donantes desde que se iniciaron los programas de TE. Hoy en día las donantes pueden ser seleccionadas por el mercado, la clasificación de la industria o simplemente el deseo del propietario de producir más descendencia de un animal en particular (Phillips & Jahnke, 2016).



Algunos criterios planteados para la selección de donantes incluyen la edad, el desarrollo del tracto reproductivo, la nutrición, la puntuación de la condición corporal, la lactancia, la paridad, los días abiertos, el medio ambiente y los factores endocrinos (Santos *et al.*, 2008; Phillips & Jahnke, 2016).

Las hembras donadoras deben tener un mínimo de 50 días post-parto, estar ciclando normalmente, estar en un plano nutricional adecuado, sin presentar deficiencias nutricionales específicas y no deben tener historia clínica de infertilidad (Colazo & Mapletoft, 2007).

En los últimos años se ha venido estudiando los niveles adecuados de Hormona Antimülleriana (AMH) para la determinación de la reserva folicular de las hembras donantes (Vernunft *et al.*, 2015). Dicha hormona es una glicoproteína que se encuentra en los folículos preantrales, folículos antrales pequeños en crecimiento, así como en las células del *cumulus oophorus* (Mossa *et al.*, 2017) y sirve como marcador para la selección de hembras con buena capacidad de respuesta a la superovulación (Souza *et al.*, 2015).

3.2.2 Producción de embriones

Hoy en día los embriones bovinos se obtienen mediante dos sistemas: la producción de embriones *in vivo* (IVD), por medio de la multiovulación y transferencia de embriones (MOET); y la producción de embriones *in vitro* (PIV) (Diez *et al.*, 2013). Según estadísticas de la IETS, en el año 2018 se produjeron aproximadamente 1,5 millones de embriones, de los cuales el 69 % corresponde a embriones *in vitro* y el 31 % a embriones *in vivo* (Viana, 2018).

3.2.3 Receptoras

Probablemente uno de los aspectos esenciales pero subestimados dentro de un programa de transferencia de embriones es la selección de receptoras, por lo tanto, la óptima selección de receptoras debe ser uno de los primeros objetivos que debe lograr un programa de TE exitoso (Phillips & Jahnke, 2016), para de esta forma garantizar que embriones genéticamente valiosos se conviertan en terneros sanos (Hansen, 2020). Es así que se debe tener un conocimiento fundamental de la ciclicidad, nivel nutricional y condición corporal,



la sincronización del estro, tamaño y conformación perineal, el manejo de enfermedades y la habilidad materna (Lamb & Mercadante, 2015).

La nutrición y la condición corporal de las receptoras constituyen un factor muy importante al momento de la TE ya que los animales extremadamente delgados o con sobrepeso tienden a tener tasas de preñez más bajas (Colazo & Mapletoft, 2007).

Las condiciones sanitarias de las receptoras constituyen también una parte importante de la estrategia de gestión de un programa de TE. Su aplicación e implementación deben llevarse a cabo mucho antes de que los animales sean utilizados como receptores. Las enfermedades específicas que deben descartarse antes de que los animales entren al programa incluyen: Diarrea viral bovina (DVB), Leucosis enzoótica bovina, Neosporosis, Paratuberculosis y Brucelosis. Al realizar estas pruebas al grupo de receptoras se asegura que estas condiciones no se conviertan en un factor limitante en la tasa de éxito del programa de TE (Phillips & Jahnke, 2016), puesto que estos patógenos están asociados a una disminución de la fertilidad, al prevenir la fertilización o al causar muerte embrionaria, pérdida fetal o disfunción ovárica (Lamb & Mercadante, 2015).

3.2.4 Diferencias al usar receptoras nulíparas o múltiparas

Aunque la utilización de vaquillas como receptoras es una práctica común en muchos lugares, esto tiene ventajas y desventajas. Por lo general, estos animales tendrán tasas de preñez más altas que las vacas, que van del 10 al 23 % (Phillips & Jahnke, 2016). Esto concuerda con un estudio realizado por Aoki *et al.* (2004), donde se señala que las tasas de preñez de embriones de PIV son significativamente más bajas en vacas Holstein (33,1 %) que en vaquillas Holstein (44 %); así mismo Ferraz *et al.* (2016) en su estudio, al evaluar la paridad de receptoras de la raza Holstein, obtuvieron tasas de preñez de 42 % para nulíparas y de 31,6 % para múltiparas.

La desventaja de las vaquillas es que son usadas para portar genética que normalmente no se selecciona para facilitar el parto, ya que el manejo de este debe ser una preocupación principal cuando se utilizan novillas como



receptoras (Phillips & Jahnke, 2016). De esta forma, las receptoras deben poseer el tamaño y peso adecuado que les permita parir sin grandes dificultades y además, deben tener buena habilidad materna para levantar al ternero de manera que le permita expresar su potencial genético (Uribe, 2018).

3.2.5 Sincronización de las receptoras

Para la sincronización de las hembras receptoras hay que considerar fundamentalmente si la transferencia va a ser con embriones frescos o con embriones congelados. Si la TE es en fresco, las receptoras en la sincronización deben estar en estro el mismo día que las donantes, para que de esta manera al momento de la transferencia coincida la misma secuencia de ovulación, favoreciendo la preñez para las receptoras una vez que ha sido transferido el embrión. Mientras que si se utilizan embriones congelados, las receptoras deben sincronizarse para que entren en estro y esperar 7 días para transferir los embriones (Orellana & Peralta, 2007).

Es necesario resaltar que un aspecto de la TE en la cual se ha avanzado es la sincronización de celos de las receptoras. Se han probado con éxito diversos protocolos en el desarrollo de las prostaglandinas y demás tratamientos hormonales. Los avances en este campo incluyen la utilización de progestágenos con protocolos que posibilitan la transferencia del embrión a tiempo fijo, sin la necesidad del difícil control del estro, con base en la inducción de la ovulación con Estradiol. A los 7-8 días después del supuesto estro, aquellas receptoras que disponen de un CL, de al menos 15-18 mm de diámetro (evaluado por medio de ultrasonografía rectal), son transferidas con un embrión. Además se puede incluir la creación de CL accesorios o complementarios, la superovulación con eCG (gonadotropina coriónica equina) o la suplementación con P4 luego de la transferencia (Colazo & Mapletoft, 2007; Martínez, 2008).

3.3 Técnica no quirúrgica de transferencia de embriones

Antes de realizar la transferencia es importante evaluar la presencia de un CL, ya que el embrión debe ser depositado en el cuerno ipsilateral al ovario donde se encuentre el CL. Se realiza palpación rectal y se utiliza el ecógrafo para ver



el estado del CL, y una vez evaluado se realiza una marca sobre la grupa del lado donde se encontró el CL (Orellana & Peralta, 2007). A decir de Alkan *et al.*, (2020), se considera razonablemente que la calidad del CL, a partir de su tamaño y consistencia, es un factor asociado al éxito en la selección de receptoras.

Luego de realizada la evaluación del CL y el vaciado del recto, un asistente tiene que lavar y secar la vulva y la zona perineal de la receptora. Seguidamente debe realizarse anestesia epidural para bloquear los movimientos rectales y el músculo del esfínter anal, lo que permitirá una mejor manipulación del útero, para lo cual se aplica 5 ml de lidocaína al 2 % entre las articulaciones del sacro y la primera vértebra coccígea (Orellana & Peralta, 2007).

Una vez que la pajuela que contiene el embrión está preparada, el técnico debe preparar la pistola de TE, para ello toma la pajuela de forma cuidadosa por el extremo donde se halla el sello de algodón, debe introducirla por la punta de la pistola de TE, de la misma manera que se haría al colocar una pajuela de semen en una pistola de Inseminación Artificial (IA). A continuación, se introduce la pistola cargada con la pajuela dentro de la vaina o catéter para TE, el cual es similar a uno de IA, difiriendo de esta en la longitud, siendo un poco más largo y de color distinto (azul), y también presenta una punta de metal con 2 orificios laterales por donde va a salir el embrión. El último paso en la preparación de la pistola de TE consiste en colocar una camisa protectora estéril plástica que posibilita mantener el catéter libre del contacto con las secreciones y exudados vaginales (Orellana & Peralta, 2007).

Después de la aplicación de la anestesia epidural y de la preparación de la pistola de TE, sin todavía colocar la mano en el recto, se debe introducir la pistola de TE en la vagina y extenderla hasta cerca del cuello uterino. Una vez allí, se procede a empujar la pistola a través de la camisa sanitaria plástica que está sobre el catéter azul. Seguidamente, se coloca la otra mano en el recto, se ubica la cervix y se estira hacia adelante, eliminando de esta forma los pliegues vaginales que puedan estar obstruyendo la pistola. Luego de esto, se pasa la pistola de TE al cuarto anillo cervical y se le mantiene momentáneamente allí.



Si el CL está a la derecha, antes de pasar la pistola al cuerpo del útero se debe retraer el cuello uterino caudalmente y luego extender la mano hacia adelante y tirar de la punta del cuerno uterino derecho hacia arriba y caudalmente. Como este cuerno no va a permanecer en esa posición por mucho tiempo, es necesario pasar rápidamente la pistola de TE al cuerno derecho y se empieza a deslizar la pistola por el cuerno, con los 4 dedos posicionados en los lados medial y ventral al cuerno, deben usarse para enderezar la pared del cuerno mientras se continua hacia adelante. Una vez que se llega a la curvatura del cuerno, se usa el pulgar y el índice para tirar del cuerno hacia adelante y hacia abajo desde su posición vertical o lateral, lo que posibilita obtener cierta distancia de la curvatura. Cada receptora representa un desafío distinto, ya que algunas permitirán el paso casi hasta la punta uterina mientras que en otras deberá depositarse cerca del inicio de la curvatura debido a su tamaño, gordura, etc., (Robertson, 2015).

Para el cuerno izquierdo, se inicia con los cuatro dedos laterales y ventrales al cuerno con el pulgar en la parte superior del cuerno. Se empuja el útero ligeramente hacia la derecha en la cavidad pélvica, lo cual permite entrar en el cuerno izquierdo de forma atraumática. Luego, se continúa atravesando el cuerno mientras que con apoyo de los dedos se empuja el cuerno de izquierda a derecha para permitir un paso directo hacia adelante. Una vez que se llega a la curvatura, se mueve la pistola con la mano que está en el exterior lo más hacia la derecha posible (lo cual mueve la punta de la pistola hacia la izquierda internamente). Con la pistola en el lumen de la curvatura, se envuelven los dedos debajo de la curvatura hacia el lado medial y se sostiene la curvatura, doblándola todo lo que se pueda y se debe deslizar la pistola lo más lejos posible sin golpear o raspar la pared, y finalmente se deposita el embrión (Robertson, 2015).

3.4 Evaluación y manejo de embriones

3.4.1 Etapa de desarrollo del embrión



El código específico para la etapa de desarrollo del embrión es numérico, partiendo desde 1 (ovocito no fertilizado) hasta 9 (blastocisto eclosionado en expansión) (Phillips & Jahnke, 2016).

Etapa 1 (Unicelular o sin fertilizar).- Un ovocito recolectado al día 7 es un ovocito sin fecundar (UFO) (**Fig. 1**).

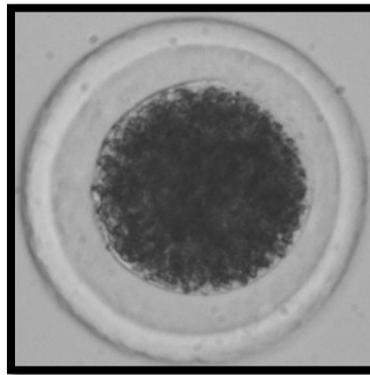


Figura 1. Ovocito sin fecundar (UFO)

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Etapa 2 (2 a 12 células).- Embriones recuperados al día 7 y contienen de 2 a 12 células que están sumamente retrasadas en su desarrollo, deben considerarse muertos o degenerados (**Fig. 2**).

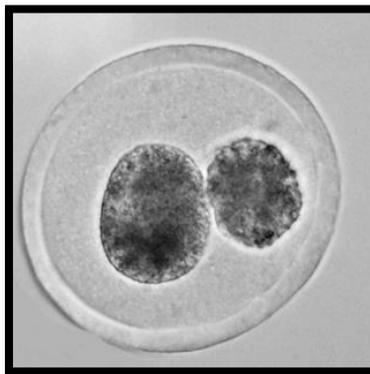


Figura 2. Embrión degenerado

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Etapa 3 (Mórula).- Contienen 16 células o más, y los blastómeros individuales son difíciles de distinguir entre sí (**Fig. 3**).

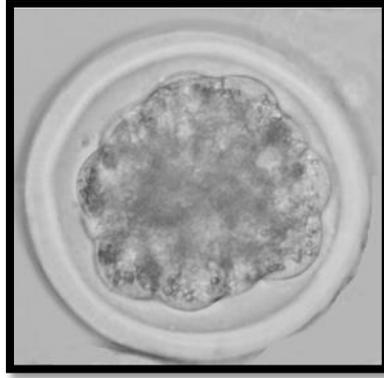


Figura 3. Mórula

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Etapa 4 (Mórula compacta).- Los blastómeros individuales forman una masa celular compacta, sin embargo las células aún no logran diferenciarse (**Fig. 4**).

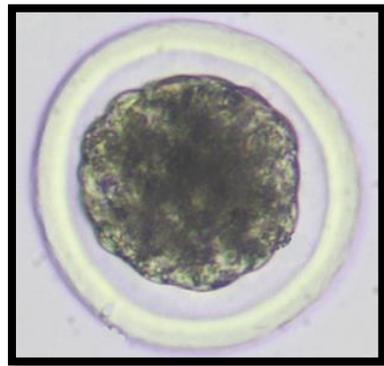


Figura 4. Mórula compacta

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Etapa 5 (Blastocisto temprano).- Dentro de la masa celular empieza a formarse una cavidad llena de líquido llamada blastocelo, la cual permite que los blastómeros se diferencien en células del trofoblasto externo y masa celular interna (**Fig. 5**).

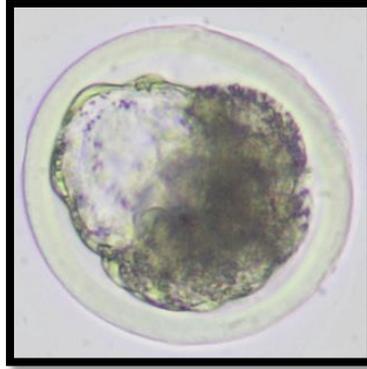


Figura 5. Blastocisto temprano

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Etapa 6 (Blastocisto).- Hay una capa trofoblástica externa, una cavidad blastocele y una masa celular interna bien definidas. El embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino (**Fig. 6**).

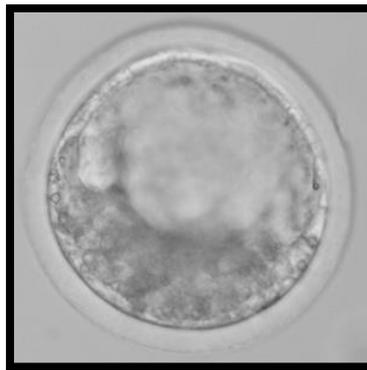


Figura 6. Blastocisto

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Etapa 7 (Blastocisto expandido).- La particularidad más notable de esta etapa es el incremento en el diámetro total del embrión así como el adelgazamiento de la zona pelúcida (**Fig. 7**).

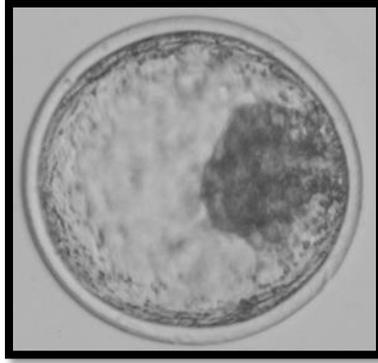


Figura 7. Blastocisto expandido

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Etapa 8 (Blastocisto eclosionado).- El embrión empieza a eclosionar o se ha salido completamente por medio de una grieta en la zona pelúcida. En algunos casos, el embrión puede colapsarse, mostrando una apariencia distinta (**Fig. 8**).

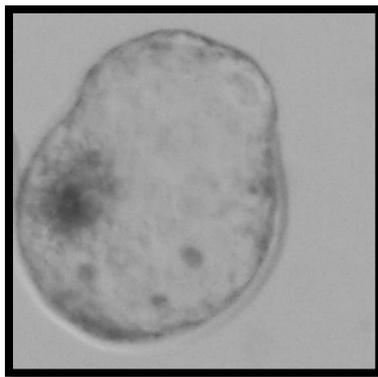


Figura 8. Blastocisto eclosionado

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Etapa 9 (Blastocisto eclosionado expandido).- El embrión incuba o eclosiona de la zona pelúcida y se vuelve a expandir (**Fig. 9**).

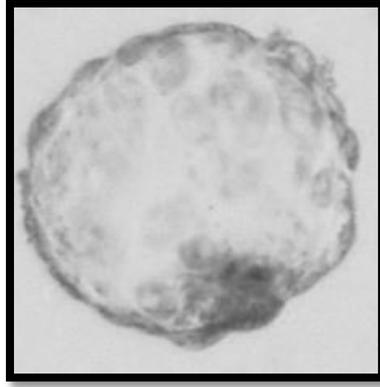


Figura 9. Blastocisto eclosionado expandido

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

3.4.2 Calidad del embrión

De acuerdo a la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria, los embriones se clasifican en 4 grados: I (excelentes y buenos), II (regulares), III (pobres) y IV (degenerados). La tasa de preñez en hembras receptoras de embriones se ve influenciada claramente por la calidad del embrión independientemente si son transferidos en fresco, criopreservados, micromanipulados o producidos *in vitro* (Mariano, 2009). En embriones *in vivo* frescos la tasa de preñez es del 76 % y del 64 % para embriones *in vivo* congelados (Hasler, 2012).

3.4.3 Congelación de embriones

La criopreservación tiene como finalidad mantener la funcionalidad de células y tejidos a bajas temperaturas, las mismas que se encuentran entre -80 y -196 °C (punto de ebullición del Nitrógeno), es así que las células y tejidos se mantienen con vida latente por tiempo indefinido. En este proceso se forma hielo intra o extracelular que puede ser dañino para los embriones, es por eso que se usan sustancias crioprotectoras para disminuir los daños a las células (Belascoain *et al.*, 2010).

El proceso de congelación fue el primero en ser introducido y actualmente es el más utilizado (Rodríguez & Jiménez, 2011), para esto es necesario el uso de crioprotectores, entre los cuales encontramos los intracelulares como el



Glicerol, Propilenglicol o Etilenglicol y los extracelulares como la Glucosa, Fructuosa, Lactosa, entre otros (Córdova *et al.*, 2015). La congelación con cualquiera de estos crioprotectores utiliza una curva lenta que ayuda a mantener un equilibrio entre los factores que pueden causar daño celular al embrión, sin embargo el Etilenglicol es el más usado por técnicos de TE ya que permite una transferencia directa sin la necesidad de extraer el crioprotector (Rodríguez & Jiménez, 2011) con una tasa de preñez entre el 50 y 70 % (Massip, 2001).

3.4.4 Supervivencia de los embriones congelados

Para el proceso de congelación lenta se utiliza el Etilenglicol como crioprotector lo cual permite la transferencia de embriones de manera directa a una receptora bovina, y se conoce como el método convencional de elección para embriones colectados *in vivo* (Do & Taylor, 2020). Dentro de este proceso se valora el porcentaje de supervivencia embrionaria a la congelación, los embriones una vez descongelados se cultivan en medio SOF (Fluido Sintético de Oviducto) para luego valorar el estado de re-expansión y de eclosión (sobrevivencia) de los embriones cada 24 h hasta completar las 72 h (Villamil *et al.*, 2012), además estos autores reportan un porcentaje de re-expansión del 86 % y una tasa de eclosión de 81 %; argumentando que el porcentaje de supervivencia disminuye debido al factor receptora y dicho porcentaje de supervivencia se representa en la preñez.

3.5 Diferencia entre transferencia de embriones frescos y congelados

La TE es idéntica a la transferencia en fresco, excepto que los embriones congelados-descongelados deben ser transferidos inmediatamente luego de la descongelación, mientras que los embriones frescos pueden mantenerse entre 6 a 8 horas antes de la transferencia (Robertson, 2015).

Según Córdova *et al.* (2015) una de las principales desventajas de congelar embriones es que la tasa de preñez obtenida con embriones congelados es 10 % inferior al de embriones frescos. Además, los embriones seleccionados para la criopreservación deben incluir la mayoría de los embriones de buena calidad que van desde las etapas 4 a 7.



En un estudio retrospectivo realizado por Hasler (2001), la tasa general de preñez resultante de la transferencia de 9.023 embriones frescos fue del 68,3 %, en comparación con el 58,4 % ($p < 0,001$) para 5.297 embriones congelados-descongelados. A decir de Hasler (2001), sugiere que la disminución en la tasa de preñez asociada con los embriones congelados-descongelados se debe a daños que no son visualmente obvios según los procedimientos de clasificación de calidad.

3.6 Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones.

3.6.1 Protocolo de sincronización para las receptoras

Tanto la IATF (Inseminación artificial a tiempo a fijo) como la TE requieren de protocolos de sincronización para que el resultado sea exitoso y los requisitos para ambos casos son similares (Baruselli *et al.*, 2015). Bo *et al.*, (2004) plantean el siguiente protocolo para la TE.

- Día 0: Administración de 2mg de Benzoato de estradiol (BE) + implante de P4 con el fin de sincronizar el desarrollo folicular.
- Día 7: Retiro del implante de P4 y administración de PGF2 α , para provocar luteólisis.
- Día 8: Administración de 1mg de BE para inducir la ovulación.
- Día 9: Se considera el día de estro.
- Día 16: Se realiza la TE.

3.6.2 Efecto del estro en programas de TE

La utilización de protocolos de sincronización para la transferencia de embriones (FTET) tiene como objetivo aumentar el número de receptoras de embriones sin la necesidad de observar o detectar la presencia de estro (Lamb *et al.*, 2016). Sin embargo en estudios realizados por Bo *et al.*, (2004) y Vera, (2017), en ganado *Bos indicus* sobre los porcentajes de preñez en vacas y vaquillonas en relación a la presencia de estro (parche pintado/no pintado) demuestran que la presencia de estro afecta positivamente los porcentajes de preñez en relación a cuando no se detecta el estro.



3.6.3 Cuerpo Lúteo

La presencia de un CL es trascendental al momento de la transferencia de embriones, dado que el embrión se depositará en el cuerno ipsilateral al ovario que contiene el CL, permitiendo así una concepción exitosa (Bartłomiej *et al.*, 2021). En novillas de carne, en el día 6 a 8 post-estro presentan un CL de alrededor de 24 mm (Spell *et al.*, 2001), sin embargo en vaquillas Holstein el CL al día 6 presenta un diámetro de 17 mm y de 24 mm al día 12 (Herzog *et al.*, 2010; Ayala *et al.*, 2017).

De acuerdo a la morfología del CL se pueden describir 2 tipos, ya sea compacto o cavitario, sin embargo esto no tiene repercusión sobre la tasa de preñez en hembras receptoras de embriones, ya que tienen la misma función que es la producción de P4 (Oyuela & Jiménez, 2010; Nogueira *et al.*, 2012; De Armas *et al.*, 2019). No obstante algunos técnicos o veterinarios optan por descartar las receptoras con CL cavitarios, pero la presencia de dicha cavidad no es suficiente para descartarlos, resultando importantísimo realizar valoraciones ecográficas así como analizar la concentración de P4 (Bartłomiej *et al.*, 2021).

3.6.4 Lugar de depósito del embrión

Al día 6 post-inseminación el embrión migra hacia el útero, transformándose en mórula temprana y en el día 7 el embrión alcanza el cuerno uterino recibiendo el nombre de blastocisto. Por lo que se recomienda hacer la recolección de estas estructuras en estos días debido a que aún no se han fijado a la pared uterina. Por lo tanto, el depósito del embrión en la receptora se debe realizar en el mismo sitio (parte craneal) del cuerno uterino ipsilateral al CL (Duica *et al.*, 2007).

En la TE se puede obtener un 69 % de preñez cuando se deposita en el tercio craneal a diferencia de 60 % si se deposita en el tercio inferior, sin embargo si se utilizan embriones de calidad 1 tal diferencia no existe (Hasler, 2010). Ongubo *et al.*, (2015) en su estudio obtuvieron mejores resultados cuando depositaron el embrión en el tercio medio (48 %), lo contrario sucedió con Roper *et al.*, (2018) y Alkan *et al.* (2020), los cuales en sus trabajos



consiguieron una tasa de preñez de 41 y 43 % respectivamente, cuando depositaron el embrión en el tercio craneal.

3.6.5 Manipulación del cuerno uterino

En el momento de depositar el embrión en las receptoras, el técnico manipula el cérvix (paso de la pistola de transferencia) y el cuerno uterino (depósito del embrión). Es por ello que existe una correlación entre el tiempo que se demora en pasar el cérvix frente a las tasas de preñez, es decir mientras más tiempo se demora en el pasaje de la cérvix menor será el porcentaje de preñez (Jaskowski *et al.*, 2010; Aguiar *et al.*, 2013; Lopes *et al.* 2015). Adicionalmente, si el técnico mantiene por más tiempo su brazo dentro de receptora hasta depositar el embrión (tiempo total), existe menos probabilidad de gestación (Roper *et al.*, 2018).

Entonces, al realizar el depósito del embrión en el útero de la receptora es importante tener en cuenta el tiempo y la dificultad para pasar el cuerno uterino, debido a que cuando es más difícil se tarda más tiempo, esto provoca una mayor manipulación y por ende se produce un aumento en la secreción de PGF2 α , siendo esto perjudicial para la viabilidad del embrión (Roper *et al.*, 2018).

3.6.6 Diagnóstico de niveles de progesterona (P4)

El nivel de P4 es de vital importancia para el embrión, ya que de ello depende la supervivencia del mismo, datos reportados por Ayala *et al.*, (2017) y corroborados (Lamb, 2005; Chagas *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2015) dicen que los niveles de P4 son de 3 ng/ml al día 6. Resultados de varias investigaciones mencionan que para establecer la gestación es necesario mantener una concentración circulante de 2 a 5 ng/ml (Lamb, 2012).

La P4 promueve a las glándulas endometriales a sintetizar factores de crecimiento, aminoácidos y carbohidratos necesarios para el desarrollo, crecimiento e implantación del embrión (Gonella *et al.*, 2013).

Para la determinación de P4 se utiliza técnicas de inmunoanálisis como: Radioinmunoensayo (RIA), ELISA y Quimioluminiscencia. Estas técnicas se



basan en la medición de cantidad de un anticuerpo (Ac) que se une a un antígeno (la hormona, Ag), lo cual está relacionado con la concentración específica de la hormona, generalmente se encuentra niveles elevados de P4 a partir del día 10 post-ovulación (Matamoros *et al.*, 2002).



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

a. Materiales Biológicos

- 40 vaquillas Holstein mestizas.
- 40 embriones congelados de calidad 1 (excelentes).

b. Materiales físicos

- Ecógrafo veterinario portátil (CONTEC® CMS600P2VET, sistema de diagnóstico de ultrasonido B; China), con una sonda lineal de 7,5 MHz.
- Kit de transferencia de embriones.
- Termo de criopreservación de embriones.
- Jeringas y agujas descartables.
- Cronómetro.
- Tubos tapa roja Vacutainer®.
- Parches detectores de celo (A.I. Tags™ C35069, USA).

c. Materiales químicos

- Dispositivos intravaginales de liberación lenta de progesterona (CIDR® 1,3g; Zoetis, Perú).
- Agente Luteolítico (Ciclase DL® 250 µg/ml; Zoetis, Perú).
- Benzoato de estradiol (Gonadiol® 1mg/ml; Zoetis, Perú).
- Lidocaína al 2 %.
- Gel lubricante.
- Kit para la cuantificación de P4: Bovine Progesterone ELISA Kit (Mybiosource Inc. MBS766057-48-Strip-Wells; California, USA).

4.2 Métodos y técnicas empleadas

4.2.1 Área de estudio



Figura 10. Mapa de la ubicación del área de estudio
Fuente: Instituto Geográfico Militar del Ecuador (1999)

Este trabajo de investigación se realizó en 10 ganaderías lecheras situadas sobre los 2.500 m.s.n.m. en las provincias de Azuay y Cañar.

La provincia del Azuay está formada por 15 cantones, los mismos que constituyen 27 parroquias urbanas y 60 parroquias rurales. En esta provincia hay dos estaciones: la seca y húmeda, a causa de la fragmentación geográfica ocasionada por la Cordillera de los Andes, teniendo en la región occidental temperaturas de entre 20 y 33 °C, mientras que en la zona andina su temperatura oscila entre 10 y 28 °C. Azuay representa el 4,92 % de la superficie de labor agrícola a nivel nacional, contando con alrededor de 430.000 cabezas de bovinos, de los cuales 94.961 son vacas en ordeño, produciendo 482.401 litros de leche diarios.

La provincia de Cañar a su vez está constituida por 7 cantones que presentan pisos climáticos similares al Azuay, teniendo por tanto climas y temperaturas muy parecidos. Esta provincia representa el 1,93 % de la labor agropecuaria nacional, donde se encuentran 149.624 bovinos, de los cuales 50.669 son



vacas en ordeño, siendo la quinta provincia con mayor producción de leche, llegando a 324.578 litros de leche diarios (INEC, 2017).

4.2.2 Procedencia de los embriones congelados

Los embriones congelados que se emplearon eran procedentes de otro proyecto de investigación, a continuación, se detalla el protocolo que fue usado en dicho proyecto para su congelación.

Los embriones fueron seleccionados y clasificados según los criterios de clasificación del IETS y se usaron únicamente los clasificados como excelentes (calidad 1).

Empaquetado de los embriones

- Las pajuelas fueron previamente identificadas.
- El Etilenglicol fue mantenido a temperatura ambiente antes de la utilización de este.
- Los embriones fueron lavados según las recomendaciones de la IETS, brevemente: los embriones seleccionados para congelación fueron lavados 3 veces en gotas o en una placa de 4 pocillos, 3 pocillos con una solución de lavado (PBS o Lactato suplementado).
- Luego estos se pasaron al cuarto pocillo que contenía el crioprotector (Etilenglicol).
- Se cargaron las pajuelas de la siguiente manera: medio, seguido de aire, medio, aire, embrión, aire, medio, aire, medio.
- Las pajuelas fueron selladas y colocadas a temperatura ambiente.
- El tiempo de estabilización embrión-crioprotector previo a la colocación dentro de la cámara no debía ser inferior a 5 min y no debía sobrepasar los 10 min.

Proceso de congelación de los embriones

- Antes de empezar la maniobra de congelación se estabilizó el equipo a 6 °C. Para ello se colocó la crio cámara directamente en el Nitrógeno líquido.
- Luego se eligió el programa y curva de crioconservación para medio Etilenglicol.



- Se procedió a colocar los embriones en la cámara de criopreservación.
- Una vez que todos los embriones se encontraron en la cámara de congelación se dio al botón “Run”, a los dos minutos se realizó el “Seeding”, con la ayuda de una pinza o un isotopo previamente sumergido en Nitrógeno líquido, mediante el contacto por un tiempo de 1 a 2 s pinza- pajuela menisco superior.
- Se tapó la cámara y a los 2 min el equipo emitió una alerta en la que se comprobó el estado de siembra.
- Se dejó que concluya la curva de congelación seleccionada.
- Una vez finalizado el protocolo se sumergieron las pajuelas directamente en Nitrógeno líquido, se dejaron por un tiempo de 5 min y quedaron listas para ser almacenadas.

4.2.3 Receptoras

Fueron seleccionadas como receptoras 40 vaquillas Holstein mestizas que pertenecían a ganaderías situadas sobre los 2.500 m.s.n.m., con un peso vivo promedio de $381 \pm 19,853$ Kg, condición corporal de $3,106 \pm 0,246$ en escala 1-5 (Wildman *et al.*, 1982), edad de $20,775 \pm 2,031$ meses, criadas y manejadas en sistemas de pastoreo, cíclicas, sanas, sin problemas reproductivos (determinado mediante examen reproductivo), con aprobación en la prueba del enhebrado y finalmente con la presencia de un CL ≥ 15 mm de diámetro, observado mediante ecografía el día de la transferencia.

4.2.4 Diseño experimental

La investigación fue de carácter descriptiva cuasi-experimental, donde se evaluaron las siguientes variables:

Independientes:

- Tamaño del cuerpo lúteo (CL).
- Niveles de Progesterona sanguínea (P4).
- Tiempo utilizado en pasar la cervix.
- Lugar de depósito del embrión.
- Tiempo total utilizado en la transferencia del embrión.



Dependiente:

- Preñez o gestación.

4.3 Metodología

4.3.1 Protocolo de la sincronización del estro y de la TE

El día 0 de inicio del protocolo se colocó un dispositivo intravaginal de liberación de P4 (CIDR® 1,3g; Zoetis, Perú) + 2 mg de Benzoato de estradiol (Gonadiol® 1mg/ml; Zoetis, Perú), por vía IM. El día 7 por la mañana se aplicó una dosis IM de 500 µg de un agente luteolítico (Ciclase DL® 250 µg/ml; Zoetis, Perú) y se retiró el dispositivo intravaginal, además se aplicó un parche colorimétrico (A.I. Tags™ C35069, USA) que nos ayudó a detectar la presentación del estro. El día 8, las vaquillas recibieron 1 mg por vía IM de Benzoato de estradiol, y 54 h posteriores al retiro del dispositivo intravaginal (día 9) se observó si los animales presentaron o no estro en base al color del parche y el día 16 recibieron la transferencia del embrión (**Figura. 11**).

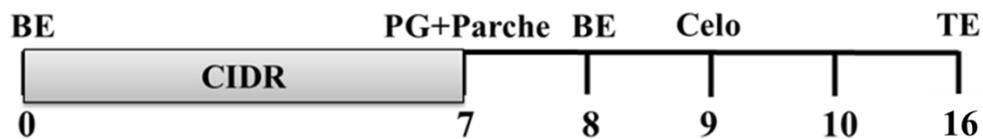


Figura 11. Protocolo de sincronización del estro y día de la transferencia de embriones en vaquillas Holstein mestizas.

4.3.2 Valoración de las características del cuerpo lúteo de la receptora

En el día 16, antes de realizar la transferencia del embrión a la receptora, se realizó una ecografía transrectal mediante un equipo portátil (CONTEC® CMS600P2VET, sistema de diagnóstico de ultrasonido B; China) con una sonda lineal transrectal con 7,5 MHz; con la finalidad de determinar la presencia o ausencia del CL en uno de los dos ovarios, las vaquillas con CL mayor a 15 mm fueron utilizadas como receptoras.

El tamaño del CL se determinó mediante la medida del ancho y largo del mismo y este valor se dividió para dos según la metodología descrita por Ayala



et al., (2017). Para el análisis estadístico los datos obtenidos fueron organizados en tres grupos en base al tamaño del CL: Grupo 1 ≤ 17 mm; Grupo 2 > 17 y < 20 mm; Grupo 3 ≥ 20 mm.

4.3.3 Preparación de la receptora para la transferencia del embrión

Los animales fueron colocados en la manga de manejo cuidando la bioseguridad de la receptora y del técnico. Luego se procedió a lavar y secar la zona perineal con una mezcla de agua y Amonio cuaternario al 2 %. A continuación se aplicó Lidocaína al 2 %, vía epidural, en el espacio intervertebral (última sacra y primera coccígea).

4.3.4 Proceso de preparación de la pajuela para realizar la transferencia

La técnica de descongelado y preparado de la pajuela con el embrión fue realizada de forma similar en todas las transferencias, brevemente: se tomó la pajuela del tanque de Nitrógeno con pinzas, se mantuvo por 5 s a temperatura ambiental, luego la pajuela fue sumergida en el termo de descongelación que contenía agua a 35 °C, esto por un lapso de 30 s, a continuación se tomó la pajuela, se secó y se armó en la pistola de transferencia, se cubrió con el catéter y se colocó una camisa sanitaria, para posteriormente transferir el embrión en la receptora.

4.3.5 Determinación del tiempo utilizado en pasar la cervix

El tiempo necesario para pasar la cervix fue considerado desde que el técnico se encontraba con la pistola de transferencia en la entrada de la cervix hasta que se pasó por completo el mismo (tiempo valorado en segundos). Este tiempo se categorizó de acuerdo con la metodología descrita por Alkan *et al.*, (2020), la cual fue modificada en cuanto al tiempo empleado en: Grupo 1 (Fácil) ≤ 30 s; Grupo 2 (Moderado) > 30 y < 60 s; Grupo 3 (Difícil) ≥ 60 s.

4.3.6 Ubicación del lugar de depósito del embrión

Se registró el lugar de ubicación del embrión, sea este: tercio craneal, medio o caudal del cuerno uterino ipsilateral al CL. Esta información la proporcionó el



técnico transferidor del embrión, que siempre fue el mismo en todas las transferencias realizadas.

Los datos obtenidos fueron agrupados en: Grupo 1 = tercio craneal; Grupo 2 = tercio medio; Grupo 3 = tercio posterior.

4.3.7 Medición del tiempo total utilizado para la transferencia

Para realizar la medición de esta variable se adaptó la metodología realizada por Roper *et al.*, (2018). Brevemente, se procedió a tomar el tiempo desde que la receptora ingresó a la manga de sujeción por primera vez, y terminó cuando el técnico retiró la pistola de transferencia de la receptora (tiempo en segundos y transformados a minutos). Luego estos resultados fueron agrupados en tres grupos: Grupo 1 (mínimo) ≤ 9 min; Grupo 2 (moderado) > 9 y < 13 min; Grupo 3 (largo) ≥ 13 min.

4.3.8 Toma de muestras de sangre para valorar los niveles de progesterona

Luego de realizar la transferencia del embrión el día 16 del protocolo, se tomó 10 ml de sangre mediante punción en la vena coccígea, con tubos Vacutainer™ tapa roja y agujas específicas para estos tubos, la muestra fue centrifugada a 2.500 rpm, durante 15 minutos, posteriormente se tomó el sobrenadante, se colocó en un vial y se congeló a -20 °C hasta su análisis, el mismo que se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Lactología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. La concentración de la P4 fue determinada mediante un test inmunológico por ELISA, el Bovine Progesterone ELISA Kit (Mybiosource Inc. MBS766057-48-Strip-Wells; California, USA) el cual tiene una sensibilidad de 0,188 ng/ml y una excelente especificidad para la detección de P4. Mide un intervalo de 0,313-20 ng/ml.

Una vez obtenidos los valores, se agruparon estos de acuerdo con la concentración de P4 en: Grupo 1 $\leq 3,7$ ng/ml; Grupo 2 $> 3,7$ y $< 4,3$ ng/ml; Grupo 3 $\geq 4,3$ ng/ml.



4.3.9 Valoración del porcentaje de gestación en las receptoras

La determinación de la gestación en las receptoras se realizó 35 días post-transferencia del embrión, mediante un ecógrafo veterinario portátil (CONTEC[®] CMS600P2VET, sistema de diagnóstico de ultrasonido B; China), con una sonda lineal de 7,5 MHz, el diagnóstico fue realizado siempre por el mismo técnico.

4.4 Análisis Estadístico

Los datos se almacenaron en Excel y luego fueron procesados en el programa estadístico SPSS versión 25.

Se determinaron estadígrafos principales en todas las variables. Se consideró la ganadería y la sesión de lavado como co-variables. Las variables tamaño de CL (Grupo 1 ≤ 17 mm; Grupo 2 > 17 y < 20 mm; Grupo 3 ≥ 20 mm), niveles de P4 (Grupo 1 $\leq 3,7$ ng/ml; Grupo 2 $> 3,7$ y $< 4,3$ ng/ml; Grupo 3 $\geq 4,3$ ng/ml), tiempo de transferencia de embriones (mínimo ≤ 9 min; moderado > 9 y < 13 min; largo ≥ 13 min), tiempo de paso del cérvix (Fácil ≤ 30 s; Moderado > 30 y < 60 s; Difícil ≥ 60 s), y el lugar de depósito del embrión (tercio craneal, medio o posterior del cuerno uterino ipsilateral al CL), fueron confrontados contra el porcentaje de preñez, mediante una prueba Kruskal-Wallis y para determinar correlación se utilizó el test de Spearman.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados generales del porcentaje de gestación obtenido al utilizar embriones congelados-descongelados

Se transfirieron un total de 40 embriones congelados-descongelados de calidad 1 (excelentes) en 40 receptoras nulíparas de raza Holstein mestiza (n= 40), obteniendo una tasa general de gestación del 42,5 %, como se detalla en la **Tabla 1.**

Tabla 1. Tasa general de preñez de las receptoras nulíparas Holstein mestizas al utilizar embriones congelados-descongelados de calidad 1.

	Frecuencia	Porcentaje (%)	Porcentaje válido
Preñada	17	42,5	42,5
Vacía	23	57,5	57,5
Total	40	100	100

La tasa de preñez que se obtuvo (42,5 %) se encuentra dentro de los valores normales o aceptables al utilizar embriones congelados-descongelados. En este contexto, Martínez *et al.*, (2002) en su trabajo determinaron un porcentaje de gestación de entre el 39 a 45,4 % cuando usaron Etilenglicol como crioprotector; de igual manera Bó *et al.*, (2004), reportan valores similares (47 %), teniendo en cuenta que las receptoras eran cruces de *Bos indicus* x *Bos taurus*. Así mismo Bényei *et al.*, (2006) en su estudio llevado a cabo en Brasil, utilizando embriones Holstein congelados por curva lenta y transferidos a receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* obtuvieron un 41 % de gestación.

5.2 Evaluación del tamaño del cuerpo lúteo (CL) frente a la tasa de preñez.

El porcentaje de gestación de las vaquillas con relación al tamaño del CL en el grupo 1 (< 17 mm) fue nula, es decir no existieron receptoras gestantes. No obstante, en los grupos 2 (> 17 y < 20 mm) y grupo 3 (> 20 mm) se observaron resultados significativamente superiores al grupo 1, pero no significativos entre

ellos ($p > 0,05$); sin embargo, se evidenció un aumento del 47,7 % (grupo 2) a 80 % (grupo 3) que puede ser representativo a la hora de valorar el tamaño del CL para receptoras en TE (**Figura 12**).

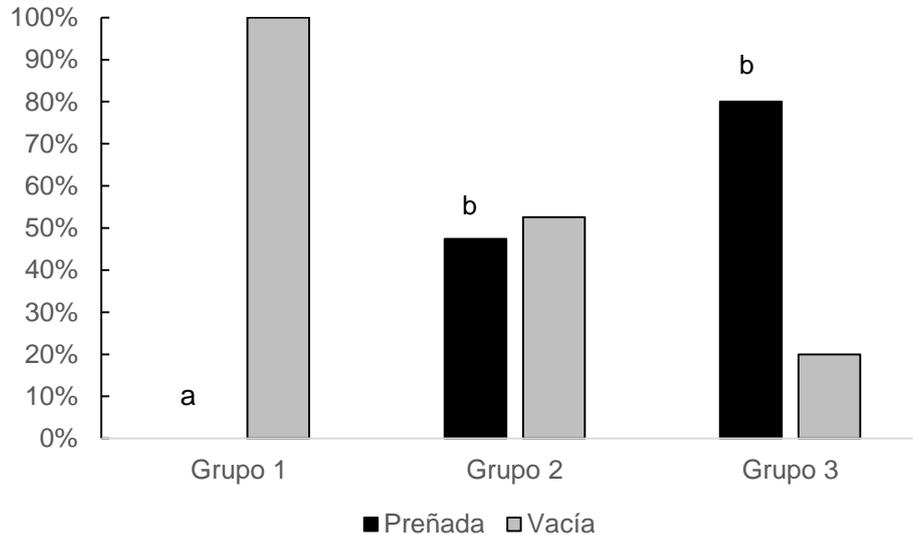


Figura 12. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo con el tamaño del CL. Grupo 1 ≤ 17 mm; Grupo 2 > 17 y < 20 mm; Grupo 3 ≥ 20 mm. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,59$; $p < 0,05$.

Estos resultados guardan concordancia con los descritos por autores como Diuca, (2010) quienes establecieron que la tasa de preñez con respecto al diámetro del CL es de 58 % cuando el diámetro del CL es de 2 cm de diámetro y 41 % para animales que presentaron 1,5 cm de diámetro, esto cuando se transfirió el embrión al día 7 post-estro. Del mismo modo Nogueira *et al.*, (2012); Gonella *et al.*, (2013); Alkan *et al.*, (2020) encontraron mayores tasas de preñez cuando el tamaño del CL fue superior.

Sin embargo, en otros trabajos se describe que no existe relación entre el tamaño del CL y el porcentaje de gestación al transferir embriones en el día 7 (Spell *et al.*, 2001; Herzog *et al.*, 2010; Hasler, 2014; Oshba *et al.*, 2019), esto podría ser concordante con la evidencia científica que menciona que el tamaño del CL no influye la producción de P4 (Pérez *et al.*, 2020).

5.3 Evaluación de los niveles de progesterona (P4) frente a la tasa de preñez.

Los niveles de P4 presentes en el suero sanguíneo obtenido de las muestras que se tomaron el día que se realizó la transferencia de los embriones (**Figura 13**) muestran tasas de preñez de 9,1 % cuando los niveles de P4 fueron menores a 3,7 ng/ml (grupo 1), 47,1 % para valores entre 3,7 a 4,3 ng/ml (grupo 2) y de 66,7 % cuando los niveles de P4 fueron superiores a 4,3 ng/ml ($p < 0,05$). Además, se determinó una correlación media positiva y significativa entre la secreción de P4 y la tasa de gestación al momento de realizar la transferencia el día 7 post-estro ($r = 0,44$; $p < 0,05$).

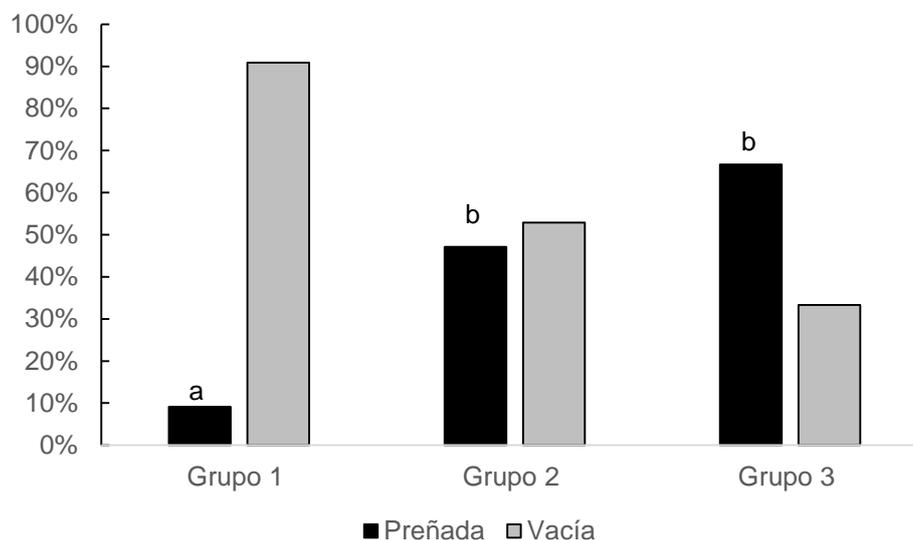


Figura 13. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo con la concentración de P4. Grupo 1 $\leq 3,7$ ng/ml; Grupo 2 $> 3,7$ y $< 4,3$ ng/ml; Grupo 3 $\geq 4,3$ ng/ml. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,44$; $p < 0,05$.

Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo están en concordancia en lo descrito por Baruselli *et al.*, (2010), quienes describieron que las tasas de gestación se ven afectadas por las concentraciones de P4, dichos investigadores, además, hacen una correlación con el tamaño del cuerpo lúteo, aduciendo a que a mayor tamaño del CL mayor producción de P4 y mejor tasa de concepción.

Sin embargo, estudios como el de Lamb, (2005), reportaron resultados buenos de las tasas de concepción en programas de transferencia incluso cuando los valores de concentración de P4 fueron tan bajos como de 0,58 ng/ml hasta

valores superiores a 16 ng/ml al momento de realizar la transferencia del embrión. Este criterio es compartido por Chagas *et al.*, (2002); Noguiera *et al.*, (2012), quienes no encontraron diferencia significativa en las tasas de gestación en novillas Holstein al utilizar embriones congelados-descongelados. Estos autores mencionan que si bien no hay un aumento de manera significativa, pero si hay tendencia a aumentar las tasas de gestación con respecto a valores mayores de concentración de P4.

Al valorar los resultados obtenidos tanto el tamaño del CL y los niveles de P4 en nuestro trabajo, podemos establecer que éstos influyen positivamente en el porcentaje de gestación en receptoras nulíparas Holstein mestizas.

5.3 Tiempo utilizado en pasar la cérvix frente a la tasa de preñez

Al evaluar el tiempo utilizado para pasar la cérvix de las receptoras, se obtuvieron tasas de preñez del 60 % cuando se tardó menos de 30 s (grupo 1), 50 % cuando se demoró entre 30 y 60 s (grupo 2), sin diferencia estadística entre estos dos grupos y finalmente, se observó un 10 % cuando tomó más de 60 s (grupo 3) para atravesar la cérvix, este grupo difiere con los grupos 1 y 2 (Figura 14).

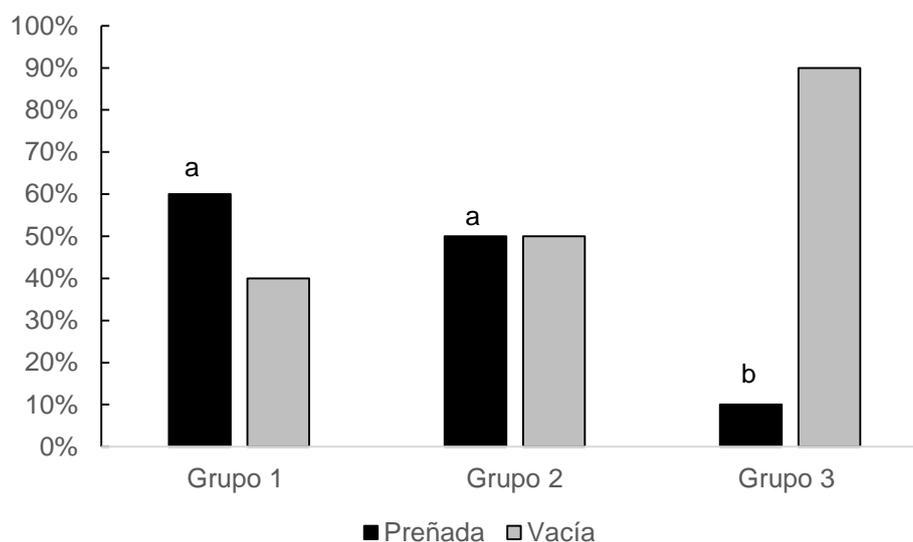


Figura 14. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo al tiempo empleado para pasar la cérvix. Grupo 1 ≤ 30 s; Grupo 2 >30 y < 60 s; Grupo 3 ≥ 60 s. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,36$; $p < 0,05$.



En este contexto, Alkan *et al.*, (2020), al clasificar a las receptoras según la puntuación del cuello uterino durante la transferencia en fácil (< 60 s), moderada (60-80 s) y difícil (> 80 s), obtuvieron tasas de gestación de 41,2 %, 34,9 % y 30,3 %, respectivamente ($p > 0,05$), sin presentar un efecto estadísticamente significativo; sin embargo se encontró que la probabilidad de gestación fue mayor cuando la puntuación del cuello uterino fue fácil (OR: 1,43) y moderada (OR: 1,29) en comparación con la difícil.

Similares resultados fueron denunciados por Aguiar *et al.*, (2013) y Lopes *et al.*, (2015), quienes informaron que las tasas de gestación en receptoras con paso cervical difícil (> 80 s) durante la TE fueron más bajas en comparación con aquellas con paso cervical fácil. Cabe mencionar que estos investigadores utilizaron Meloxicam, un inhibidor de la Ciclooxygenasa-2 (COX-2), dividiendo a las receptoras en dos grupos: Control (CON) y Meloxicam (MEL). Aguiar *et al.*, (2013), observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en la tasa de gestación entre los grupos CON y MEL (23,91 % vs 66,13 %) en vaquillas que presentaban cuello uterino de Grado II (> 80 s), atribuyendo sus resultados a un posible aumento de la producción de PGF₂ α endometrial en respuesta a la manipulación cervical/uterina prolongada requerida en hembras con un mayor grado de dificultad para pasar el catéter. Por su parte en el estudio de Lopes *et al.*, (2015), considerando los animales con un cuello uterino de grado II, las tasas de gestación no fueron estadísticamente significativas entre los grupos MEL y CON (54,54 % y 42,86 %, respectivamente), pero si hay una diferencia numérica.

Jaśkowski *et al.*, (2010), en su estudio determinaron que si el tiempo necesario para la inserción de los embriones en el útero fue de 10-60 s, la tasa de gestación llegaba al 53,4 %. Por el contrario, si el tiempo necesario para depositar el embrión en el cuerno uterino superaba los 60 s, la tasa de gestación bajaba a un 20,4 %; llegando a afirmar que cuanto mayor sea el tiempo de paso a través del cuello uterino hasta el sitio de depósito del embrión en el útero, menor será la tasa de concepción en las receptoras.

Los resultados de estas investigaciones y lo encontrado en el presente trabajo, permite afirmar que el tiempo necesario para atravesar la cérvix es un factor determinante en las tasas de concepción de las receptoras.

5.4 Lugar de depósito del embrión en el cuerno uterino frente a la tasa de preñez.

En cuanto a la evaluación del sitio de depósito del embrión en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con CL, se obtuvieron tasas de gestación del 60 % cuando el embrión fue depositado en el tercio craneal (Grupo 1), del 37,5 % cuando fue depositado en el tercio medio (Grupo 2) y del 42,1 % cuando se depositó en el tercio posterior (Grupo 3). No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos ($p > 0,05$) (Figura 15).

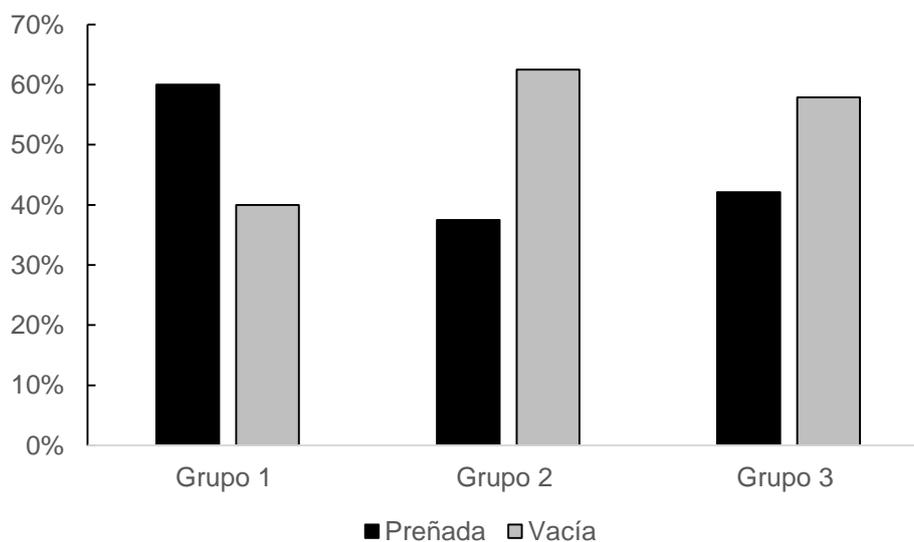


Figura 15. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo al lugar de depósito del embrión. Grupo 1 = craneal; Grupo 2 = medio; Grupo 3 = posterior. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,05$; $p > 0,05$.

Alkan *et al.*, (2020), en su estudio obtuvieron mayor tasa de preñez cuando los embriones se colocaron en el tercio craneal del cuerno uterino con un 41,06 %, mientras que al depositar los embriones en el tercio medio la tasa de preñez fue de 29,67 % ($p < 0.05$), existiendo por tanto una diferencia estadísticamente significativa. Generalmente, el embrión llega desde el oviducto hasta el útero aproximadamente 6-8 días post fertilización (Bilodeau-Goeseels & Kastelic, 2003). Es así como en los lavados uterinos al día 7, los embriones son recolectados principalmente de la parte craneal del cuerno uterino (Sponchiado



et al., 2019). Por todo ello, se recomienda transferir los embriones al tercio craneal del cuerno uterino con el fin de lograr mejores tasas de gestación (Hasler, 2010).

Así también, Roper *et al.*, (2018), determinaron que la tasa de gestación basada en la ubicación de la transferencia de embriones tendió a diferir ($p = 0,08$) cuando el embrión se depositó en el tercio craneal (43 %), tercio medio (31 %) o tercio caudal (24 %) del cuerno uterino; específicamente, hay una notable diferencia proporcional cuando se comparan las regiones del tercio craneal con respecto al tercio medio y caudal. A decir de los autores, estos resultados indican que es más probable que los embriones depositados en el tercio craneal del cuerno ipsilateral al CL resulten en una gestación después de la TE, pero es importante considerar el nivel de dificultad para colocar el embrión en el tercio craneal del cuerno uterino cada vez que se transfiere un embrión.

Por su parte Ongubo *et al.*, (2015), lograron una mayor tasa de concepción cuando los embriones se depositaron en el tercio medio del cuerno uterino (48,84 %), en comparación con el tercio inferior (26,92 %) y el tercio superior (20,93 %); el análisis de regresión realizado mostró que el sitio de depósito influyó significativamente en la tasa de concepción, con el tercio medio produciendo una tasa significativamente mayor ($p < 0,05$) que el tercio superior e inferior. De acuerdo con los autores, esto puede atribuirse al hecho de que el útero no estaba listo para la implantación con respecto al depósito en el tercio inferior; y que el tercio superior también tiene una tasa de concepción más baja porque hay mucha manipulación al intentar depositar el embrión lo que podría provocar lesiones o estrés en la receptora y así reducir la tasa de concepción. Sin embargo, cabe destacar que al tratarse de un estudio retrospectivo los investigadores dan a conocer que las bajas tasas de concepción obtenidas pueden atribuirse a factores asociados con la falta de instalaciones adecuadas para el programa de TE como microscopios modernos, el manejo de la alimentación, la eficiencia de la detección del estro, la mortalidad embrionaria temprana causada por el estrés durante las transferencias y la presencia de quistes ováricos.

Los resultados de investigaciones recientes, y lo encontrado en éste trabajo indica que la tasa de gestación en las receptoras es mayor cuando los embriones son depositados en el tercio craneal del cuerno uterino ipsilateral al CL, pero se debe considerar el nivel de dificultad que conlleva aquello, tomando en cuenta aspectos como obstrucciones en el tracto uterino, comportamiento de la receptora y experiencia del técnico.

5.5 Tiempo total de transferencia frente a la tasa de preñez

Al valorar el tiempo total empleado en realizar la transferencia del embrión se obtuvieron tasas de gestación del 58,3 % cuando se demoró menos de 9 min (Grupo 1), 41,2 % cuando se utilizaron entre 9 y 13 min (Grupo 2), y 27,3 % cuando se requirió más de 13 min (Grupo 3) en completar la maniobra ($p > 0,05$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, sin embargo, el porcentaje de gestación tiende a ser mayor cuando el tiempo total para realizar la transferencia es menor, aunque esta no sea significativa en el estudio (**Figura 16**).

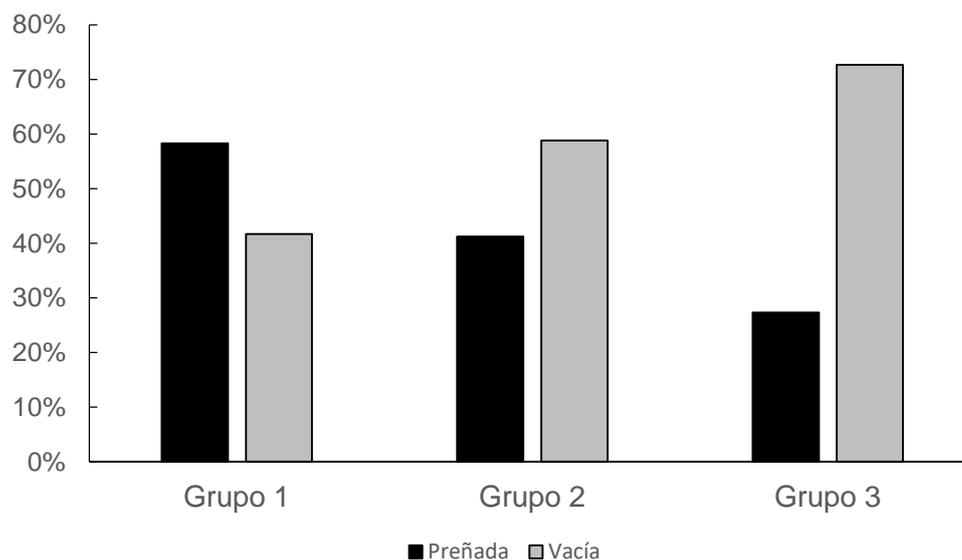


Figura 16. Porcentaje de gestación en los diferentes grupos de acuerdo con el tiempo total empleado en realizar la transferencia del embrión. Grupo 1 ≤ 9 min; Grupo 2 > 9 y < 13 min; Grupo 3 ≥ 13 min. Prueba de Kruskal-Wallis. Valor de correlación $r = 0,24$; $p > 0,05$.

Existe literatura limitada en cuanto a la valoración de esta variable, únicamente se encontró que Roper *et al.*, (2018) han evaluado el tiempo total empleado en realizar la transferencia del embrión. Dichos investigadores en su estudio



agruparon a las receptoras de acuerdo con el tiempo transcurrido para completar la transferencia del embrión en: mínimo (6 a 9 min), moderado (10 a 13 min) y largo (14 a 25 min), alcanzando tasas de gestación de 60, 37 y 25 %, respectivamente, lo que denota un efecto estadísticamente significativo ($p = 0,03$). Ellos exponen que el tiempo total para realizar la TE está asociado con la puntuación de cuello uterino y, siguiendo esta línea de pensamiento, las transferencias más difíciles requieren más tiempo para completar la transferencia, lo cual aumenta la manipulación del tracto, conduciendo a una mayor liberación de $\text{PGF2}\alpha$. Las células de un embrión en etapa de mórula y blastocisto poseen receptores para $\text{PGF2}\alpha$, la cual es perjudicial para la viabilidad de los embriones en las primeras etapas de desarrollo (Scenna *et al.*, 2004; Scenna *et al.*, 2005). Por todo esto, Roper *et al.*, (2018) señalan que cuando al técnico le toma menos tiempo completar la transferencia, hay una mejora en las tasas de concepción, recalcando que resulta muy importante minimizar el tiempo total necesario para realizar las tareas involucradas en la TE y llevar de vuelta a los animales al entorno físico en el que residían antes de que se realizara la transferencia.

Otros investigadores como Kasimanickam *et al.*, (2018) que, si bien no valoran específicamente el tiempo total para completar la transferencia del embrión, han manifestado que las tasas de gestación fueron más bajas después de la transferencia de embriones cuando fue difícil de realizar, lo cual incluye transferencia con máxima dificultad, con manipulación extrema del tracto genital y con depósito del embrión en la mitad superior del cuerno uterino.

Los resultados de las investigaciones descritas y lo encontrado en el presente trabajo permiten señalar que el tiempo total empleado para realizar la transferencia del embrión, que incluyen las evaluaciones iniciales de las estructuras ováricas, el tiempo necesario para preparar el embrión y la cantidad de tiempo para completar la transferencia; es un factor influyente en las tasas de gestación dentro de los programas de TE.



6. CONCLUSIONES

Las receptoras que poseen un cuerpo lúteo mayor a 20 mm en el momento de la transferencia del embrión tienen mayor probabilidad de establecer una gestación con respecto a las receptoras con CL inferior a 17 mm.

Los niveles idóneos de P4 en sangre deben ser superiores a 4,3 ng/ml para que la tasa de gestación no se vea afectada.

En un programa de TE, el tiempo necesario para pasar la cérvix debe ser el menor posible (< 30 s) lo que puede evitar la liberación de PGF2 α y obtener mejores resultados en cuanto a la tasa de gestación.

Durante la TE congelados-descongelados las tasas de gestación en las receptoras no se vieron afectadas de forma significativa cuando se depositó el embrión en el tercio craneal, medio o caudal del cuerno uterino, pero el porcentaje de gestación tiende a ser mayor cuando los embriones son depositados en el tercio craneal del cuerno uterino ipsilateral al CL.

Finalmente, si bien el tiempo total que se demora un técnico de TE no influye de manera significativa sobre las tasas de gestación, es importante mencionar que si se evidenció un aumento representativo porcentual cuando se requirió menos de 9 min con respecto a si se demora más de 13 min en completar la transferencia.



7. RECOMENDACIONES

En un programa de TE es importante considerar el CL tanto en su tamaño como en su funcionalidad (secreción de P4), ya que están directamente correlacionados con las tasas de gestación de las receptoras.

Se debe continuar con el estudio de estas variables con un número de animales más grande para fortalecer los resultados actuales.



BIBLIOGRAFÍA

- Aguiar, T., Araújo, C., Tirloni, R., & Martins, L. (2013). Effect of Meloxicam on pregnancy rate of recipient heifers following transfer of *in vitro* produced embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6), 984–988. <https://doi.org/10.1111/rda.12197>
- Alkan, H., Karaşahin, T., Dursun, Ş., Erdem, H., & Güler, M. (2020). Evaluation of the factors that affect the pregnancy rates during embryo transfer in beef heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, 421–428. <https://doi.org/10.1111/rda.13623>
- Aoki, S., Murano, S., Miyamura, M., Hamano, S., Terawaki, Y., Dochi, O., & Koyama, H. (2004). Factors affecting on embryo transfer pregnancy rates of *in vitro*-produced bovine embryos. *Reproduction, fertility and development*, 16(2), 206. <https://doi.org/10.1071/rdv16n1ab168>
- Ayala, L., Pesántez, J., Rodas, E., Méndez, S., Soria, M., Torres, S.,... Pesántez, R. (2017). Tamaño del folículo ovulatorio, cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. *Revista de Reproducción Animal*, 29(2), 65–72.
- Baillargeon P, Fecteau G, Paré J, Lamothe P, Sauvé R. (2001). Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 18(11), 1803-6. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.1803>
- Bartłomiej, M., Bostedt, H., Gehrke, M., & Jaskowski, J. (2021). Ultrasound characteristics of the cavitary corpus luteum after oestrus synchronization in heifers in relation to the results of embryo transfer. *Animals*, 11(6), 1-13. <https://doi.org/10.3390/ani11061706>
- Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., Gimenes, L. U., Sá Filho, M. F., Martins, C. M., ... Bó, G. A. (2011). Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76(9), 1583-



1593. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.006>

Baruselli, P., Marques, M., Viera, L., Konrad, J., & Crudeli, G. (2015). Aplicación de biotecnologías para una mayor producción de terneros. *Revista Veterinaria*, 26(2), 154–159. <http://dx.doi.org/10.30972/vet.262231>

Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Vieira, L. M., Souza, A. H., Bó, G. A., & Rodrigues, C. A. (2020). Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology*, 155, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.028>

Belascoain, M., Díaz, É., & Huter, S. (2010). Técnicas para la criopreservación de embriones bovinos (Tesis de Posgrado). Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado de: <https://silo.tips/download/tecnicas-para-la-criopreservacion-de-embryones-bovinos>

Bényei, B., Komlósi, I., Pécsi, A., Pollott, G., Marcos, C. H., de Oliveira Campos, A., & Lemes, M. P. (2006). The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Animal Reproduction Science*, 93(3-4), 268-279. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.012>

Bilodeau-Goeseels, S., & Kastelic, J. P. (2003). Factors affecting embryo survival and strategies to reduce embryonic mortality in cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 83(4), 659-671. <https://doi.org/10.4141/A03-029>

Bó, G., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., & Tríbulo, H. (2004). Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus*, 4(21), 25-45.

Bó, G. A., Cedeño, A., & Mapletoft, R. J. (2019). Strategies to increment *in vivo* and *in vitro* embryo production and transfer in cattle. *Animal Reproduction*, 16(3), 411-422. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0042>

Carvalho, T., Reis, M., De Sousa, J., Rodrigues, R., Cushman, R., & Camisao, J. (2015). Factors affecting pregnancy rates after Ovum Pick Up derived embryo transfer in lactating Holstein recipients under tropical conditions. *Ciência e Agrotecnologia* 39(5), 498–505. <https://doi.org/10.1590/S1413->



70542015000500008

Chagas, J., Lopes, L., & Silva, J. R. (2002). Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58, 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00906-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00906-8)

Colazo, M., & Mapletoft, R. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*, 9, 20-37. Recuperado de <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n09a03colazo.pdf>

Córdova Izquierdo, A., Guerra Liera, J. E., Villa Mancera, A., Olivares Pérez, J., Cansino Arroyo, G., Juárez Mosaqueda, M. D. L., & Pérez Gutiérrez, J. F. (2015). Congelación de embriones bovinos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9(2). https://doi.org/10.5209/rev_rccv.2015.v9.n2.51041

De Armas, R., De Gracia, J., & Solís, A. (2019). Incidencia de cuerpos lúteos compactos (CLcom) o cavitarios (CLc), *in vitro* y su efecto sobre los resultados de preñez después de la transferencia de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Revista Investigaciones Agropecuarias*, 1(2), 1–14.

Diez, C., Muñoz, M., Caamaño, J., & Piñeiro, E. (2013). Estado actual de los sistemas de producción de embriones en ganado bovino. *Tecnología Agroalimentaria*, 12, 35-39.

Diuca, A. (2010). Efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/7399/780174.2010.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Do, V. H., & Taylor, A. W. (2020). Cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos by vitrification: in pursuit of a simplified, standardized procedure that improves pregnancy rates to promote cattle industry use.



Biotechnology in Animal Husbandry, 36(3), 251–270.
<https://doi.org/10.2298/BAH2003251H>

Dochi, O. (2019). Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos and its application in cattle reproduction management. *Journal of Reproduction and Development*, 65(5), 389-396. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-025>

Duica, A., Tovío, N., & Grajales, H. (2007). Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, (14), 107–124.

Ferraz, P. A., Burnley, C., Karanja, J., Viera-Neto, A., Santos, J. E. P., Chebel, R. C., & Galvão, K. N. (2016). Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology*, 86(7), 1834-1841. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.032>

García, D. (2015). Transferencia de embriones en fresco, en vacas lecheras, utilizando dos protocolos hormonales de inseminación artificial a tiempo fijo, adicionando eCG y sin adicionar eCG (Tesis de Pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://200.12.169.19/bitstream/25000/10224/1/T-UCE-0014-024.pdf>

Gonella, A., Holguín, G., Montaña, D., & Valbuena, D. (2013). Corpus luteum diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data analysis from 17.521 embryo transfers from a commercial *in vitro* bovine embryo production program. *Animal Production Science*, 10(2), 106–111.

Hansen, P. J. (2019). Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: Implications for fertility and assisted reproduction. *Animal Reproduction*, 16(3), 497-507. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0053>

Hansen, P. J. (2020). The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *Journal of Animal Science*, 98(11), 1-20. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa288>



- Hasler, J. F. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56(9), 1401-1415. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00643-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00643-4)
- Hasler, J. F. (2006). The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology*, 65(1), 4-16. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.002>
- Hasler, J. F. (2010). Bovine embryo transfer: are efficiencies improving? *Applied Reproductive Strategies Conference Proceeding, (August 5 and 6)*, 265–282.
- Hasler, J. F. (2012). Bovine embryo transfer: Are efficiencies improving? *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle December 3-4, 2012; Sioux Falls, SD*, 319–340.
- Hasler, J. F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 152-169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Herzog, K., Brockhan, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Nieman, H., & Bollwein, H. (2010). Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*, 73, 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.016>
- INEC (2017). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2017. Recuperado de: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Informe_Ejecutivo_ESPAC_2017.pdf
- Instituto Geográfico Militar de Ecuador (1999). Mapa político del Ecuador 1999. Recuperado de: https://www.gifex.com/detail/2011-11-01-14754/Mapa_politico_del_Ecuador_1999.html
- Jaskowski, J., Urbaniak, K., Antosik, P., & Wlodarczyk, R. (2010). The influence



- of transfer gun passage time through the uterine cervix on pregnancy rate in recipient heifers. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58(1), 125–132. <https://doi.org/10.1556/AVet.58.2010.1.13>
- Kasimanickam, R. K., Hall, J. B., Estill, C. T., Kastelic, J. P., Joseph, C., Abdel Aziz, R. L., & Nak, D. (2018). Flunixin meglumine improves pregnancy rate in embryo recipient beef cows with an excitable temperament. *Theriogenology*, 107, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.043>
- Lamb, C. (2005). Factors affecting an embryo transfer program. *Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 223–232.
- Lamb, G. (2012). Managing embryo transfer to improve success. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle December 3-4, 2012, Sioux Falls, SD*.
- Lamb, G. C., Vitor, R., & Fontes, P. (2016). Donor and recipient management to optimize embryo technology success. *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle – Des Moines, Iowa*, 197–209.
- Lamb, G. C., & Mercadante, V. R. G. (2015). Selection and management of the embryo recipient herd for embryo transfer. En *Bovine Reproduction* (First Edit, pp. 723-732). Florida.
- Looney, C.R., Nelson, J.S., Schneider, H.J., Forrest, D.W., (2006). Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology* 65(1), 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.023>
- Lopes, L. M. J., Balbinot, M., Fonseca, B. A., de Araújo, C. V., & Martins, L. R. (2015). Pregnancy rates and serum 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α concentrations in recipient Nelore heifers treated with meloxicam after the transfer of *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology*, 84(4), 553-558. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.010>
- Mariano, J. (2009). Transferencia de embriones frescos a tiempo fijo : algunas variables que afectan la tasa de preñez. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Recuperado de: <https://www.produccion->
Página | 62



animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embionario/32-a_tiempo_fijo.pdf

Martínez, D. (2008). Situación actual de la transferencia embrionaria. Revisión y actualización. *Frisona Española*, 74-80. Recuperado de <http://www.revistافرisona.com/Portals/0/articulos/n164/A16401.pdf>

Martínez, A., Brogliatti, G., Varlcarcel, A., & De las Heras, M. (2002). Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogenology*, 58(5), 963–972. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00936-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00936-6)

Massip, A. (2001). Review cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(2), 49–55. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00248.x>

Matamoros, R., Gomez, C., & Andaur, M. (2002). Hormonas de utilidad diagnóstica en medicina veterinaria. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200003>

Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D., Weber-Nielsen, M., Evans, A. C. O., & Ireland, J. J. (2017). Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction*, 154(1), R1-R11. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0104>

Nogueira, É., Cardoso, G. S., Romero, H., Junior, M., Dias, M., Carlos, L., ... Borges, J. C. (2012). Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. *Revista Brasileira de Zootecnia*, (9), 2129–2133. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000900022>

Ongubo, M. N., Rachuonyo, H. A., Lusweti, F. N., Kios, D. K., Kitilit, J. K., Musee, K., ... Oliech, G. O. (2015). Factors affecting conception rates in cattle following embryo transfer. *Uganda Journal of Agricultural Sciences*, 16(1), 19–27. <http://dx.doi.org/10.4314/ujas.v16i1.2>

Orellana, J., & Peralta, E. (2007). Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies (Proyecto de Pregrado). Universidad Zamorano, Honduras. Recuperado de [Página | 63](#)



<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/758/1/T2520.pdf>

Oshba, M., Sosa, G., Nossier, M., Fadel, M., & El-Raey, M. (2019). The effect of recipient Holstein heifers' corpus luteum type, diameter and secretory potential on their pregnancy rate during routine ET program in Egypt. *Benha Veterinary Medical Journal*, 36(1), 77–87. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2019.103399>

Oyuela, L., & Jiménez, C. (2010). Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.*, 57, 191–200.

Pérez, A., Segura, J. C., & Peralta, J. A. (2020). Factors associated with pregnancy rate in fixed-time embryo transfer in cattle under humid-tropical conditions of México. *Animal Reproduction*, 17(2), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0007>

Phillips, P. E., & Jahnke, M. M. (2016). Embryo transfer (techniques, donors, and recipients). *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 32(2), 365-385. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.008>

Robertson, E. (2015). Embryo collection and transfer. En *Bovine Reproduction* (pp. 703-707). Tennessee.

Rodríguez, P., & Jiménez, C. (2011). Criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.*, 58(2), 107–119.

Roper, D. A., Schrick, F. N., Edwards, J. L., Hopkins, F. M., Prado, T. M., Wilkerson, J. B., ... Smith, W. B. (2018). Factors in cattle affecting embryo transfer pregnancies in recipient animals. *Animal Reproduction Science*, 199, 79-83. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.11.001>

Santos, J. E. P., Cerri, R. L. A., & Sartori, R. (2008). Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, 69(1), 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.010>

Scenna, F. N., Edwards, J. L., Rohrbach, N. R., Hockett, M. E., Saxton, A. M., &



- Schrick, F. N. (2004). Detrimental effects of prostaglandin F2 α on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 73(3-4), 215-226. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.02.001>
- Scenna, F. N., Hockett, M. E., Towns, T. M., Saxton, A. M., Rohrbach, N. R., Wehrman, M. E., & Schrick, F. N. (2005). Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 78(1-4), 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2005.02.003>
- Souza, A. H., Carvalho, P. D., Rozner, A. E., Vieira, L. M., Hackbart, K. S., Bender, R. W., ... Wiltbank, M. C. (2015). Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 169-178. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
- Spell, A., Beal, W., Corah, L., & Lamb, G. (2001). Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 56(2), 287-297. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00563-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00563-5)
- Sponchiado, M., Gonella-Diaza, A. M., Rocha, C. C., Turco, E. G. L., Pugliesi, G., Leroy, J. L. M. R., & Binelli, M. (2019). The pre-hatching bovine embryo transforms the uterine luminal metabolite composition *in vivo*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44590-9>
- Stringfellow D.A, Givens M.D, Waldrop J.G. (2004). Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reproduction Fertility Development*, 16(2), 93-102. <https://doi.org/10.1071/RD03082>
- Stroud, B., & Hasler, J., (2006). Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* 65(1), 65-76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.007>
- Uribe, C. (2018). Evaluación del porcentaje de preñez por transferencia de embriones para los predios Centenario y Fundadores durante el periodo 2015 a 2017 (Tesis de Pregrado). Corporación Universitaria Lasallista,



Caldas, Antioquia, Colombia. Recuperado de:
http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/2191/1/Evaluacion_porcentaje_prenez_transferencia_embryones.pdf

Vera, J. (2017). Efecto del celo y el tratamiento con GnRH sobre la tasa de concepción en programas de inseminación artificial y transferencia de embriones bovinos (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Recuperado de:
<https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/5236>

Vernunft, A., Schwerhoff, M., Viergutz, T., Diederich, M., & Kuwer, A. (2015). Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. *Journal of Reproduction and Development*, 61(1), 74-79. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-091>

Viana, J. (2018). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter-IETS*, 36(4), 1-26.

Villamil, P. R., Lozano, D., Oviedo, J. M., Ongaratto, F. L., & Bó, G. A. (2012). Developmental rates of *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos cryopreserved in ethylene glycol based solutions by slow freezing or solid surface vitrification. *Animal Reproduction*, 9(2), 86–92.

Wildman, E. E., Jones, G. M., Wagner, P. E., Boman, R. L., Troutt, H. F., & Lesch, T. N. (1982). A dairy cow Body Condition Scoring System and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*, 65(3), 495-501. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82223-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82223-6)

Wrathall A.E, Simmons H.A, Bowles D.J, Jones S. (2004). Biosecurity strategies for conserving valuable livestock genetic resources. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(2), 103-112. <https://doi.org/10.1071/RD03083>



ANEXOS

Anexo 1. Ficha de datos de las receptoras utilizada en la investigación

FICHA DE VALORACIÓN DE RECEPTORAS (VAQUILLAS)

“Influencia del cuerpo lúteo, lugar de depósito del embrión y tiempo de transferencia de embriones congelados-descongelados sobre la tasa de preñez en receptoras Holstein mestizas”

1.-Datos generales:

- Receptora N° _____
- Raza _____
- Edad _____
- Peso _____
- Propietario _____
- Ubicación del hato _____

2.-Anamnesis:

- Fecha de participación último evento de exposición _____
- ¿Ha sido repetidora? (SI /NO)
- Fecha de último celo _____
- Fecha de último servicio _____

3.-Historial clínico:

- Última enfermedad presentada _____
- Fecha de último tratamiento _____
- Fármacos aplicados _____

4.-Revisión clínica:

- Condición corporal (1-5) _____

5.-Chequeo ginecológico:

- Ubicación del útero (pelvis; entre pelvis y cavidad abdominal; cavidad abdominal)
- Cuerno derecho (limpio/sucio)
- Cuerno izquierdo (limpio/sucio)

6.-Prueba del enhebrado

- 1.-Fácil.....
- 2.-Moderado.....
- 3.-Difícil.....

7.-Durante el protocolo de sincronización:

7.1. Mancha parche el día de celo Si ...; No....

8.-Durante el proceso de transferencia

8.1.-Tiempo de inicio de la maniobra de transferencia.....

8.2.-Tiempo final de la maniobra de transferencia.....

8.3.-Tiempo requerido para el proceso de transferencia en total.....



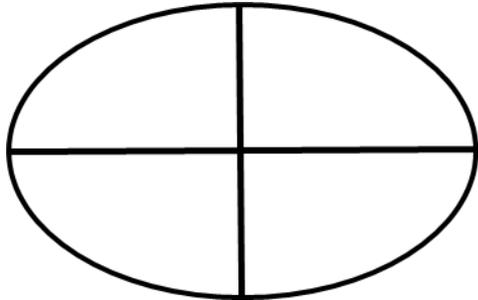
9.-Características del CL

9.1.-Tamaño del CL (en mm).....

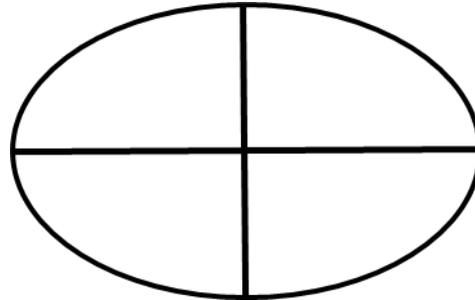
9.2.-Clase de CL; Compacto.....; Cavitario.....

9.3.-Ubicación del CL; OD.....; OI.....

OD



OI



10.-Características de la cérvix

10.1.-Tiempo que se requiere para pasar la cérvix

11.-Características de los niveles de P4

11.1.-Nivel de P4.....

12.-Ubicación del embrión

-Anterior (relación al ovario)

-Medio

-Posterior (en relación al ovario)

13.-Diagnóstico de gestación (35 días); preñada.....; vacía.....

14.-Calidad de embrión transferido.....

Nombre y firma del responsable



Anexo 2. Receptoras seleccionadas para la investigación



Anexo 3. Prueba del enhebrado a receptoras



Anexo 4. Valoración del cuerpo lúteo (CL) mediante ultrasonografía previo a la transferencia de embriones



Anexo 5. Proceso de transferencia de embriones



Aplicación de lidocaína al 2 %, vía epidural



Proceso de descongelamiento de la pajueta que contiene el embrión previo a la transferencia.



Proceso de preparación de la pajueta que contiene el embrión.
Colocación en la pistola de transferencia.



Inicio de la maniobra de TE, y paso de la cérvix.



Depósito del embrión en el cuerno uterino



Toma de muestra de sangre de la vena coccígea de una receptora para medir niveles de P4.



Anexo 6. Diagnóstico de gestación al día 35 pos-transferencia del embrión

