



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL

Sede Santo Domingo

DIRECCIÓN GENERAL DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**APLICACIÓN DE SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST) EN
LA SUPEROVULACIÓN DE EMBRIONES**

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar el grado de Magister en
Producción Animal

AUTOR:

Mario Bolívar García Bustillos

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Francisco Iván Caiza De la Cueva, Ph. D.

SANTO DOMINGO – ECUADOR

JUNIO, 2016

TEMA DE TESIS

“APLICACIÓN DE SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST) EN LA SUPEROVULACION DE EMBRIONES”

Dr. Francisco Iván Caiza De la Cueva, Ph. D.

DIRECTOR DE TESIS

APROBADO

Dra. Luz María Martínez Buñay, MSc.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Juan Humberto Avellaneda Cevallos, Ph. D.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Richard Ivan Rodríguez Hidalgo, Ph. D.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Santo Domingo, 25 de junio de 2016.

CERTIFICACIÓN DEL ESTUDIANTE DE AUTORÍA DEL TRABAJO

Yo **Mario Bolívar García Bustillos**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, el mismo que no ha sido plagiado y que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional.

Además; y, que de acuerdo a la Ley de Propiedad Intelectual, todos los derechos del presente trabajo de investigación pertenecen a la Universidad Tecnológica Equinoccial, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.



Ing. Mario Bolívar García Bustillos

CI: 0502903776

INFORME DE APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE GRADO**APROBACIÓN DEL DIRECTOR**

En mi calidad de Director del Trabajo de Grado “**APLICACIÓN DE SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST) EN LA SUPEROVULACION DE EMBRIONES**”, presentado por el Sr. *Mario Bolívar García Bustillos*, previo a la obtención del Grado de Magister en Producción Animal, considero que dicho trabajo no ha sido plagiado y reúne los requisitos y disposiciones emitidas por la Universidad Tecnológica Equinoccial por medio de la Dirección General de Posgrado para ser sometido a la evaluación por parte del Tribunal examinador que se designe.

En la Ciudad de Santo Domingo, a los 25 días del mes de junio del 2016



Dr. Francisco Iván Caiza De la Cueva, Ph. D.

CI: 1708356546

FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO
TESIS DE TITULACIÓN

| DATOS DE CONTACTO | |
|----------------------|--------------------------------|
| CÉDULA DE IDENTIDAD: | 0502903776 |
| APELLIDOS Y NOMBRES: | García Bustillos Mario Bolivar |
| DIRECCIÓN: | TUMBACO – QUITO |
| EMAIL: | mariobolivar05@hotmail.com |
| TELÉFONO FIJO: | 022376652 |
| TELÉFONO MOVIL: | 0984488922 |

| DATOS DE LA OBRA | |
|-------------------------------|--|
| TÍTULO: | Aplicación de somatotropina recombinante bovina (rbST) en la superovulación de embriones |
| AUTOR O AUTORES: | García Bustillos Mario Bolivar |
| FECHA DE ENTREGA DE LA TESIS: | 20/05/2016 |
| DIRECTOR DE TESIS: | Dr. Francisco Iván Caiza De la Cueva, Ph.D. |
| PROGRAMA | PREGRADO <input type="checkbox"/> POSTGRADO <input checked="" type="checkbox"/> |
| TÍTULO POR EL QUE OPTA | Magister en Producción Animal |
| RESUMEN: Mínimo 250 palabras | <p>La presente investigación se realizó en la parroquia Machachi, cantón Mejía de la provincia de Pichincha, en la Hacienda San Carlos de Pulpito de propiedad de Agrifranca-Biogensa, el objetivo fue evaluar el efecto de la somatotropina recombinante bovina (rbST) en la superovulación de embriones en vacas de carácter lechero utilizando el producto Lactotropina® que contiene 500 mg de rbST. Fueron seleccionadas 10 vacas donantes de raza Holstein cruzadas y divididas en dos grupos de 5 vacas: Grupo 1 = sin rbST y Grupo 2 = con rbST (500 mg). El protocolo de superovulación se realizó de la siguiente manera: Día cero (0), colocación intravaginal del dispositivo CIDR, del día siete (7) al diez (10) aplicación de la FSH dos aplicaciones diarias 7 am y 7 pm. Se aplicó 50 mg por cada dosis (100 mg/día), día nueve (9) retiro del dispositivo CIDR y aplicación de Prostaglandina (500 µg de cloprostenol – Estrumate) en dos aplicaciones am/pm (250 µg/aplicación), a partir de la tarde del día diez, se inició la detección de celo hasta la mañana del día once, se inició la inseminación artificial a partir de la tarde del día once y se repitió en la mañana del día doce, siete (7) días después de</p> |

| | |
|--------------------------------|--|
| | <p>la primera inseminación se realizó la recolección de embriones. El uso de la rbST se realizó sobre el mismo protocolo descrito con la incorporación de los 500 mg de rbST, 72 horas antes del inicio de la superovulación, es decir el día 4to. Para el análisis de las variables: cuerpos lúteos, total de estructuras colectadas, calidad de embriones y embriones transferibles se utilizó la Prueba de Chi-cuadrado, Análisis de Varianza y prueba DMS para comparación de medias. No se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) para las variables: cuerpos lúteos, número de estructuras / vaca, blastocisto, blastocisto expandido, grado de calidad, embriones transferibles y no transferibles. Se encontró diferencias significativa ($p<0,10$) para el estadio de desarrollo embrionario Mórula y para el Grado 1 de Calidad en el estadio de Mórula.</p> |
| <p>PALABRAS CLAVES:</p> | <p>Superovulación, Embriones, Somatotropina, Lactotropina®</p> |
| <p>ABSTRACT:</p> | <p>ABSTRACT</p> <p>This research was carried out in the parish Machachi, Canton Mejia, province of Pichincha, in the “San Carlos de Pulpito” ranch whose owner is Agrifranca-Biogensa. The objective was to evaluate the effect of the recombinant bovine somatotropin (rbST) in the superovulation of embryos in cows of character milkman using the product Lactotropina® containing 500 mg of rbST.</p> <p>There were selected 10 cows of Holstein breed cross and divided in two groups of 5 cows: Group 1 = without rbST and group 2 = rbST (500 mg). The superovulation protocol was carried out in the following way: day zero (0), intravaginal device CIDR, on day seven (7) to ten (10) application of two FSH 7 am and 7 pm daily applications. There were applied 50 mg per dose (100 mg/day), day nine (9) withdrawal of the device CIDR and application of prostaglandin (500 µg of Cloprostenol Sodium Salt - Estrumate) in two applications am/pm (250 µg/application), in the afternoon of day ten, it was started the detection of heat until morning of day eleven, the artificial insemination began in the afternoon of day eleven and it was repeated in the morning of day twelve, and seven (7) days after the first insemination was done the collection of embryos.</p> <p>The use of the rbST was carried out on the same protocol described with the incorporation of the 500</p> |

| | |
|------------------|--|
| | <p>mg of rbST, 72 hours before the start of the superovulation, that is, the day 4th. For the analysis of the variables: corpora lutea, total structures collected, quality of embryos and embryos transferable, there were applied the Chi-square test, Analysis of Variance and Test DMS for comparison of means. No significant differences were found ($p>0.05$) for the variables: corpora lutea, number of structures / cow, blastocyst, blastocyst expanded, degree of quality, embryos transferable and non-transferable. There was found significant differences ($p<0.10$) to the stage of embryonic development morula and for grade 1 of Quality in the stage of Morula.</p> <p>Key words: Superovulation, embryo, somatotropin, Lactotropina®</p> |
| KEYWORDS: | Superovulation, Embryos, Somatotropin, Lactotropina® |

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución.



MARIO BOLÍVAR GARCÍA BUSTILLOS

C.I.: 0502903776

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **MARIO BOLIVAR GARCIA BUSTILLOS**, CI 0502903776 autor/a del proyecto titulado: **TITULO “Aplicación de somatotropina recombinante bovina (rbST) en la superovulación de embriones”** previo a la obtención del título de **Magister en Producción Animal** en la Universidad Tecnológica Equinoccial.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad Tecnológica Equinoccial a tener una copia del referido trabajo de graduación con el propósito de generar un Repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Santo Domingo, 25 de junio del 2016



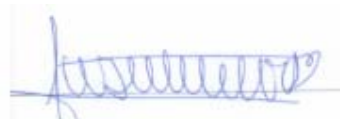
MARIO BOLÍVAR GARCÍA BUSTILLOS

C.I.: 0502903776

Machachi, 29 de abril de 2016

**CARTA DE
AUTORIZACIÓN**

Yo, **Dr. Francisco Iván Caiza De la Cueva**, con CI: 1708356546, en calidad de Gerente General de la empresa ProduBiogensa, autorizo a **MARIO BOLIVAR GARCIA BUSTILLOS**, realizar la investigación para la elaboración de su proyecto de titulación “**Aplicación de somatotropina recombinante bovina (rbST) en la superovulación de embriones**” en las instalaciones de la Hacienda San Carlos de Púlpito.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Francisco Caiza De la Cueva', written over a horizontal line.

Dr. Francisco Caiza De la Cueva

CI: 1708356546

DEDICATORIA

A Papito Dios, por protegerme y guiarme a encontrar mi Gloria, la razón de ser en esta vida.

A mi Padre, Abelardo García (+), mi Ángel en el cielo, porque con su disciplina me impulso siempre a seguir adelante y a superar mis limitaciones y a mi Madre, Teresita Bustillos, que con su amor, paciencia y delicadeza siempre ha estado pendiente de mis metas profesionales y mi vida. Dios los bendiga Papito Abel y Mamita Tere

A mis Mágicas Princesas: Antonella Teresita y Arianita Valentina, porque transformaron mi vida y su amor no tiene límites y a Juliancito que nos devolvió la esperanza y la alegría. Que Dios y Papito Abel guie sus caminos.

A mi Esposa Alexandra Maribel, por el hogar que construimos día a día y a nuestro pequeño Príncipe, una bendición que es el sello de amor en mi Familia.

A mi ñaña Clemencia Alejandra, la alegría del hogar.

A todos quienes luchan en el campo día a día y ponen en práctica lo aprendido, crean experiencias y producen alimentos sanos para todos.

A mi Patria, porque es sin duda el mejor lugar del mundo.

Mario Bolívar

AGRADECIMIENTO

A nuestro Padre Dios y a mi Divino Niño por darme la fortaleza, voluntad en todo momento, porque nunca me abandonan.

A mis Padres, porque todo lo que he logrado y he vivido ha sido por sus enseñanzas, su apoyo incondicional y sobre todo su amor.

A mi Esposa y mis Princesas, por regalarme parte de su tiempo para este trabajo.

A Clemen, Juliancito y Edwin, por el apoyo en todo momento y mantenernos siempre unidos.

A mis suegros y cuñados por estar pendientes de mi Familia.

Al Dr. Francisco Caiza por sus consejos, guía y amistad más allá de las aulas.

A Produbiogensa, por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación.

A la hacienda Agri-Franca, por permitir el uso de sus instalaciones y animales.

A los técnicos de Produbiogensa, por su apoyo en la conclusión de este trabajo.

A todos los profesores de la Maestría en Producción Animal, porque son ejemplo de profesionales y por compartir su conocimiento con la esperanza de la difusión a través de sus estudiantes en beneficio de los productores y el país.

A todos mis compañeros, que ahora son amigos y hermanos, por todo ese apoyo, sustos, alegrías y excelente tiempo compartido.

A la Universidad Tecnológica Equinoccial, por la apertura de siempre en favor de que se genere más conocimiento en beneficio del sector agropecuario del país.

Mario Bolívar

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|--------------|-------------|
| RESUMEN..... | xvi |
| SUMMARY..... | xvii |

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

| | |
|---|---|
| 1.1. Objetivos de la investigación..... | 4 |
| 1.1.1. Objetivo general | 4 |
| 1.1.2. Objetivos específicos..... | 4 |
| 1.2. Hipótesis | 4 |
| 1.2.1. Hipótesis Específicas..... | 4 |

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

| | |
|--|----|
| 2.1. Antecedentes..... | 5 |
| 2.2. Fundamentaciones | 9 |
| 2.2.1. Aspectos de la fisiología reproductiva | 9 |
| 2.2.2. Tratamiento superovulatorio. | 14 |
| 2.2.3. Factores que afectan la superovulación..... | 20 |
| 2.2.4. Lavado y colecta de embriones | 21 |
| 2.2.5. Búsqueda de embriones..... | 21 |
| 2.2.6. Evaluación de embriones | 23 |
| 2.2.7. Conservación de embriones | 31 |
| 2.2.8. Factores de crecimiento..... | 31 |
| 2.2.9. Somatotropina bovina recombinante (rbST). | 31 |
| 2.2.10. Efectos del Factor de Crecimiento parecido a la Insulina Tipo 1 (IGF-1)..... | 33 |
| 2.2.11. Ultrasonografía reproductiva | 34 |

CAPÍTULO III**MATERIALES Y MÉTODOS**

| | |
|---|----|
| 3.1. Sitio de estudio | 36 |
| 3.2. Instrumentos y recursos | 37 |
| 3.3. Diseño experimental, factores y variables de estudio..... | 38 |
| 3.3.1. Tipo de diseño | 38 |
| 3.3.2. Número de tratamientos | 38 |
| 3.3.3. Número de unidades experimentales | 39 |
| 3.3.4. Variables de estudio | 39 |
| 3.3.5. Factores | 40 |
| 3.4. Método estadístico | 40 |
| 3.5. Manejo del experimento | 41 |
| 3.5.1. Superovulación..... | 41 |
| 3.5.2. Lavado uterino y recolección de embriones..... | 41 |
| 3.5.3. Búsqueda y Evaluación de embriones..... | 42 |
| 3.5.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos..... | 42 |
| 3.5.5. Manejo de Donadoras | 42 |
| 3.5.6. Características de las vacas para la investigación | 44 |

CAPÍTULO IV..... 45**RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 45**

| | |
|--|----|
| 4.1. Número de Cuerpos lúteos y estructuras recolectadas | 45 |
| 4.2. Etapa de desarrollo embrionario de las estructuras | 46 |
| 4.3. Grados de Calidad de las estructuras recolectadas | 47 |
| 4.4. Grados de Calidad para la etapa de Mórula..... | 48 |
| 4.5. Estructuras transferibles y no transferibles..... | 50 |

CAPÍTULO V**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

| | |
|--------------------------|----|
| 5.1. Conclusiones..... | 52 |
| 5.2. Recomendación | 52 |

BIBLIOGRAFÍA..... 53**ANEXOS 57**

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 3.1. Condiciones meteorológicas del sitio del experimento | 36 |
| Tabla 3.2. Detalle de instrumentos y recursos..... | 37 |
| Tabla 3.3. Esquema del ANOVA | 40 |
| Tabla 4.1. Número de cuerpos lúteos promedio y estructuras por vaca recolectadas | 45 |
| Tabla 4.2. Número promedio de estructuras según su etapa de desarrollo | 46 |
| Tabla 4.3. Tabla de contingencia entre tratamientos para las estructuras obtenidas | 47 |
| Tabla 4.4. Número promedio de estructuras según su grado de calidad | 47 |
| Tabla 4.5. Tabla de contingencia entre tratamientos según su grado de calidad..... | 48 |
| Tabla 4.6. Número promedio de mórulas con base en su grado de calidad | 49 |
| Tabla 4.7. Tabla de contingencia entre tratamientos para calidades de mórula | 49 |
| Tabla 4.8. Número promedio de embriones transferibles y no transferibles..... | 50 |
| Tabla 4.9. Tabla de contingencia para embriones transferibles y no transferibles..... | 51 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Procedimiento de búsqueda de los embriones | 22 |
| Figura 2. Desarrollo y tránsito embrionario en el tracto genital..... | 23 |
| Figura 3. Fotos de ovocitos y embriones..... | 26 |
| Figura 4. Embriones bovinos: ejemplo de etapa de desarrollo y calidad. Etapas 1 a 5..... | 29 |
| Figura 5. Embriones bovinos: ejemplos de etapas de desarrollo y calidad. Etapas 5 a 9... | 30 |
| Figura 6. Posibles efectos del IGF-1 en los ovocitos y la preimplantación del desarrollo embrionario durante la superovulación en ganado | 34 |
| Figura 7. Esquema del tratamiento sin rbST | 38 |
| Figura 8. Esquema del tratamiento con rbST | 39 |
| Figura 9. Efecto del tratamiento rbST sobre la calidad de mórulas | 49 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Análisis de variancia del número de cuerpos lúteos y estructuras recolectadas/vaca en la comparación de tratamientos con y sin rbST | 57 |
| Anexo 2. Análisis de variancia del número de estructuras según su etapa de desarrollo en la comparación de tratamientos con y sin rbST | 57 |
| Anexo 3. Análisis de variancia del número de estructuras según su grado de calidad en la comparación de tratamientos con y sin rbST | 57 |
| Anexo 4. Análisis de variancia del número de mórulas con base en su grado de calidad en la comparación de tratamientos con y sin rbST | 57 |
| Anexo 5. Análisis de variancia del número de embriones transferibles y no transferibles en la comparación de tratamientos con y sin rbST | 58 |
| Anexo 6. Resumen Estadístico de las variables representativas | 58 |
| Anexo 7. Resumen Estadístico del total de estructuras | 58 |
| Anexo 8. Prueba de Chi-cuadrado para el Grado de Desarrollo Embrionario | 58 |
| Anexo 9. Prueba de Chi-cuadrado para la calidad de estructuras | 60 |
| Anexo 10. Prueba de Chi-cuadrado para el Grado de Morulación | 61 |
| Anexo 11. Prueba de Chi-cuadrado para las estructuras transferibles y no transferibles.... | 62 |
| Anexo 12. ANOVA de cuerpos lúteos | 63 |
| Anexo 13. ANOVA de Total de Estructuras | 63 |
| Anexo 14. ANOVA para Desarrollo Embrionario (Mórulas) | 64 |
| Anexo 15. ANOVA de Grado 1 de Calidad de Total de Estructuras | 64 |
| Anexo 16. ANOVA de Grado 2 de Calidad de Total de Estructuras | 65 |
| Anexo 17. ANOVA de Grado 3 de Calidad de Total de Estructuras | 65 |
| Anexo 18. ANOVA de Grado 1 de Calidad de Mórula | 66 |
| Anexo 19. ANOVA de Grado 2 de Calidad de Mórula | 66 |
| Anexo 20. ANOVA de Grado 3 de Calidad de Mórula | 67 |
| Anexo 21. ANOVA de Embriones Transferibles | 67 |
| Anexo 22. Fotografías | 68 |



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL

“Aplicación de somatotropina recombinante bovina (rbST) en la superovulación de embriones”

Autor: Mario Bolívar García Bustillos

Director: Dr. Francisco Iván Caiza De la Cueva, Ph. D.

Fecha: Junio del 2016

RESUMEN

La presente investigación se realizó en la parroquia Machachi, cantón Mejía de la provincia de Pichincha, en la Hacienda San Carlos de Pulpito de propiedad de Agrifranca-Biogensa, el objetivo fue evaluar el efecto de la somatotropina recombinante bovina (rbST) en la superovulación de embriones en vacas de carácter lechero utilizando el producto Lactotropina® que contiene 500 mg de rbST. Fueron seleccionadas 10 vacas donantes de raza Holstein cruzadas y divididas en dos grupos de 5 vacas: Grupo 1 = sin rbST y Grupo 2 = con rbST (500 mg). El protocolo de superovulación se realizó de la siguiente manera: Día cero (0), colocación intravaginal del dispositivo CIDR, del día siete (7) al diez (10) aplicación de la FSH dos aplicaciones diarias 7 am y 7 pm. Se aplicó 50 mg por cada dosis (100 mg/día), día nueve (9) retiro del dispositivo CIDR y aplicación de Prostaglandina (500 µg de cloprostenol – Estrumate) en dos aplicaciones am/pm (250 µg/aplicación), a partir de la tarde del día diez, se inició la detección de celo hasta la mañana del día once, se inició la inseminación artificial a partir de la tarde del día once y se repitió en la mañana del día doce, siete (7) días después de la primera inseminación se realizó la recolección de embriones. El uso de la rbST se realizó sobre el mismo protocolo descrito con la incorporación de los 500 mg de rbST, 72 horas antes del inicio de la superovulación, es decir el día 4to. Para el análisis de las variables: cuerpos lúteos, total de estructuras colectadas, calidad de embriones y embriones transferibles se utilizó la Prueba de Chi-cuadrado, Análisis de Varianza y prueba DMS para comparación de medias. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para las variables: cuerpos lúteos, número de estructuras / vaca, blastocisto, blastocisto expandido, grado de calidad, embriones transferibles y no transferibles. Se encontró diferencias significativa ($p < 0,10$) para el estadio de desarrollo embrionario Mórula y para el Grado 1 de Calidad en el estadio de Mórula.

Palabras Claves: superovulación, embriones, somatotropina, Lactotropina®



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL

“Application of recombinant bovine somatotropin (rbST) in embryo superovulation”

Autor: Mario Bolívar García Bustillos

Director: Dr. Francisco Iván Caiza De la Cueva, Ph. D.

Fecha: Junio del 2016

SUMMARY

This research was conducted in Machachi, Mejía, province of Pichincha, in San Carlos de Pulpito Farm, property of Agrifranca-Biogensa, the objective was to evaluate the effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) in the superovulation of embryos in cows dairyness using the Lactotropina® product containing 500 mg rbST. 10 Holstein crossed cows donors were selected and divided into two groups of 5 cows: Group 1 = no rbST and Group 2 = with rbST (500 mg). Superovulation protocol was performed as follows: Day zero (0), intravaginal CIDR device placement, day seven (7) to ten (10) FSH injection twice daily 7 am and 7 pm, 50 mg was applied for each dose (100 mg / day), day nine (9) CIDR removal device and application of Prostaglandin (500 micrograms cloprostenol - Estrumate) in two applications am / pm (250 mg / application). From evening day ten (10), heat detection began until the morning of the eleventh day, artificial insemination began from the afternoon of eleven day, was repeated on the morning of the twelfth day. Seven (7) days after first insemination, embryo collection was done. The use of rbST was performed on the same protocol as described above with the addition of 500 mg of rbST, 72 hours before the start of superovulation, it means the 4th day. For the analysis of the variables: corpora lutea, total collected structures, quality of embryos and transferable embryos the Chi-square test, analysis of variance and LSD test for comparison of means was used. Corpora lutea, number of structures / cow, blastocyst, expanded blastocyst, quality grade, transferable and non-transferable embryos: No significant differences ($p > 0.05$) were found for the variables. Significant differences ($p < 0.10$) for Morula stage of embryonic development and Quality Grade 1 in the morula stage was found

Keywords: Superovulation, Embryos, Somatotropin, Lactotropina®

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Con los avances de la manipulación del ciclo estral de las hembras bovinas en las últimas décadas, han permitido obviar el celo y emplear técnicas que se basen en el momento de la ovulación para inseminar artificialmente; no obstante, pese a las ventajas de los métodos de sincronización de la ovulación, aún existen grandes problemas en cuanto a tasa de preñez efectiva generada por muerte embrionaria relacionada ya sea con la calidad del ovocito o con la capacidad de reconocimiento del embrión por parte de la vaca. (Yanza, 2013, p.1) A pesar de llevar más de 30 años, las tasas de superovulación y de preñez no se han mejorado sustancialmente. El número de ovulaciones varía entre 0 y 40 y, además, un 30% de las vacas superovuladas no responden al tratamiento o producen muy pocos embriones de mala calidad (Jiménez, 2009, p.195). “La eficiencia de la transferencia de embriones está influenciada por los caracteres biológicos de la población femenina en el programa y los factores ambientales” (Szabari, 2008, p.20).

Sin embargo, a pesar de que actualmente se cuenta con técnicas y protocolos para desarrollar programas de transferencia de embriones, aún permanece un problema que es constante para cualquier especialista dedicado a la producción de embriones in vivo, éste es la variabilidad en la respuesta superestimuladora, lo cual se refiere a una incapacidad para normalizar la respuesta ovulatoria (número de cuerpos lúteos) así como la producción de embriones transferibles dentro y entre animales superestimulados (donadoras) (González, 2013, p.1).

El control del ciclo estral puede reducir los problemas de manejo asociados a la detección de celo en vacas lecheras pero no influye directamente sobre el porcentaje de concepción ya que está en dependencia de otros factores adicionales como la nutrición, por lo que el uso de somatotropina bovina recombinante (rbST) que se ha comprobado que aumenta los niveles circulantes de insulina e IGF-1 y actúa sinérgicamente con las hormonas gonadotrópicas, abre la posibilidad de mejorar la tasa de concepción y preñez (Yanza, 2013, p.2).

Sin embargo, para mejorar la eficiencia reproductiva del hato, se han realizado estudios empleando la somatotropina recombinante bovina (rbST) en combinación con los protocolos de sincronización de celo, con la finalidad de mejorar la calidad de los embriones y poder aumentar las tasas de concepción y preñez, así como el mejoramiento de la calidad y cantidad

de embriones transferibles por súper-ovulación, con resultados satisfactorios (Yanza, 2013, p.2).

En el ganado lechero, la inyección de rbST provoca un incremento de las concentraciones séricas de IGF-I y esta hormona participa en la regulación de la función ovárica y en el desarrollo embrionario temprano. El aumento de los niveles séricos de IGF-I promueve la esteroidogénesis y la maduración del folículo dominante (Alvarado, 2013, p.10).

La somatotropina bovina recombinante (rbST) es una hormona que ha sido utilizada como complemento a los programas de producción de embriones, debido a su capacidad para estimular el reclutamiento y desarrollo folicular (González, 2013, p.1).

La utilización de 500 mg de rbST en esta investigación se basa principalmente en que:

Cuando se realiza el tratamiento aplicando al mismo tiempo la rbST y FSH, los resultados en ovulación y recuperación de embriones son poco relevantes, pero, cuando se aplica la rbST previo al inicio de los estímulos con gonadotropina, ambos resultados mejoran significativamente. De esta manera, el uso de rbST puede ser benéfico si se aplica previamente (72h) para aumentar el número de folículos emergentes al momento de inicio del tratamiento con gonadotropinas incrementando la tasa de embriones recuperados (Garzón et al., 2007, p.72).

Jousan como se citó en Hernández y Gutiérrez (2013) señala que después de la inyección subcutánea de 500 mg de rbST, los niveles de IGF-I aumentan y se mantienen elevados durante 14 d.

Con respecto a la dosis de rbST González (2013) señala y cita cuatro autores cuyos trabajos indican que: en general, dosis de rbST inferiores a 35,7 mg/día (500 mg / 14 días) tienen un efecto positivo sobre la reproducción animal y justamente en su investigación utilizando dosis de 62,5 mg/día (1000 mg / 14 días) se incrementó el número de embriones degenerados que probablemente se debe a un efecto negativo de la hormona y animales con un alto grado de sensibilidad de la misma, generándose condiciones anormales para la producción de un ovocito competente así como para el adecuado desarrollo del embrión.

El IGF-1 acelera el progreso meiótico de ovocitos bovinos en pequeños (<3 mm) folículos y los embriones más viables se puede obtener en ovejas y ganado cuando una mayor población de folículos alrededor de 3 mm de tamaño está presente en el momento de la estimulación. En consecuencia, los incrementos en las concentraciones de IGF-1 sanguíneos inducidos por el tratamiento de rbST se han asociado con un mayor número de folículos entre 2 y 5 mm de diámetro. Este tratamiento también fue eficaz en el aumento de la respuesta superovulatoria en el ganado. Aumentos estadísticamente significativos en la tasa de ovulación en términos de número de cuerpos lúteos y la viabilidad del embrión debido al tratamiento con rbST se han encontrado en algunos, pero no todos los estudios. La variabilidad entre los experimentos podría estar relacionado con varios factores, incluyendo la dosis de rbST, el método de examen de ovario, el tipo y dosis de gonadotropina, y tanto en número como condición corporal de los animales utilizados en estos estudios. El efecto de la rbST ha sugerido que está mediada a través de GH, IGF-1 y la insulina actuando por separado o en sinergia (Velásquez et al., 2009, p.165).

La intención en esta investigación fue mantener elevados los niveles de rbST desde el día 4 al día 18 (periodo de experimentación) y determinar el efecto de la hormona tanto en el número de cuerpos lúteos en el ovario, como en el número y calidad de embriones recolectados.

1.1.Objetivos de la investigación

1.1.1. Objetivo general

Evaluar la aplicación de somatotropina recombinante bovina (rbST) en la superovulación de embriones.

1.1.2. Objetivos específicos

Comparar mediante ultrasonografía el número de cuerpos lúteos, en un protocolo de superovulación con y sin el uso de somatotropina recombinante bovina (rbST).

Evaluar el efecto de la adición de somatotropina recombinante bovina (rbST) en las etapas de desarrollo y calidad de embriones obtenidos, en un protocolo de superovulación en bovinos.

1.2.Hipótesis

1.2.1. Hipótesis Específicas

El uso de la somatotropina recombinante bovina (rbST) incrementa el número de cuerpos lúteos, comparado mediante ultrasonografía en un protocolo de superovulación.

La adición de 500 mg de rbST incrementará el número y calidad de embriones obtenidos en un protocolo de superovulación.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Moreira, Badinga, Burnley y Thatcher (2002) realizaron un experimento cuyo objetivo fue determinar el efecto de somatotropina recombinante bovina (rbST) sobre la fertilización y el desarrollo embrionario temprano después de que las vacas reciban un tratamiento de superovulación. Quisieron además, probar si los embriones recolectados de vacas tratadas con rbST eran más propensos de sobrevivir después de la transferencia a las receptoras y evaluar si tratando a las receptoras con rbST se afectaba la tasa de preñez. Ocho vacas lactantes y 4 vacas no lactantes de raza Holstein donadoras fueron superovuladas, inseminadas en celo detectado y asignadas a un grupo control no tratado o a un grupo tratado recibiendo una sola inyección de rbST (500 mg, subcutánea) al momento de la inseminación. Los embriones provenientes de donadoras del tratamiento rbST (embriones-rbST) o control (embriones-control) fueron transferidos a receptoras Holstein lactantes que recibieron tanto un tratamiento rbST un día después del estro (500 mg, sc; receptoras-rbST) o ningún tratamiento (receptoras-control). La cantidad de óvulos sin fertilizar por lavado fue menor para rbST que para el control ($1,0 \pm 0,9 < 3,7 \pm 0,9$; $p < 0,04$). El porcentaje de embriones transferibles fue mayor para rbST que para el control ($77,2\% > 56,4\%$; $p < 0,01$). El número de blastocitos por lavado fue mayor para rbST que el control ($2,4 \pm 0,7 > 0,4 \pm 0,7$; $p < 0,04$). Las tasas de preñez después de la transferencia fueron 25,6% para receptora-control/embrión-control, 43,2% para receptora-rbST/embrión-control, 56,1% para receptora-control/embrión-rbST y 43,3% para receptora-rbST/embrión-rbST. La transferencia de embriones-rbST incrementó las tasas de preñez comparada con la transferencia de embriones-control.

En el Estado de Minas Gerais, Neves, Ramos y Marques Junior (2005) estudiaron el uso de somatotropina recombinante bovina (rbST) en donadoras Holstein superovuladas para incrementar el número y calidad de embriones. Cuarenta vacas fueron asignadas aleatoriamente en tres grupos: control (n=15), tratadas con 250 mg de rbST (n=11) y tratadas con 500 mg de rbST (n=14) en el sexto día del ciclo estral. En el día 10 después del estro las donadoras fueron sometidas a un tratamiento de superovulación con 360 mg de FSH en dosis decrecientes, dos veces al día, con un intervalo de 12 horas. De los 40 animales

superovulados el 86,7%, 100% y 78,6% de los grupos I, II y III respectivamente, respondieron al tratamiento con recolección de estructuras. El 20% del grupo I, el 18% del II y el 21,4% del III no produjeron embriones viables, esto es, no hubo diferencia entre los grupos en cuanto a la respuesta al tratamiento y al porcentaje de hembras que produjeron embriones viables ($p > 0,05$). De los tres animales (7,5%) que no respondieron al tratamiento, dos (13,3%) eran del grupo I y uno (7,5%) del grupo III. La respuesta de las donadoras fue homogénea: 13,1% en el grupo I produjeron el 30% de los embriones, 27,3% en el grupo II produjeron el 61,2% y el 14,2% en el grupo III, 64,6%. Concluyen entonces que la utilización de rbST antes del inicio de la superovulación no aumentó el número de estructuras totales recolectadas, sin embargo, aumento el porcentaje de embriones viables ($p < 0,05$) independientemente de la dosis utilizada de 250 o 500 mg, sin alterar la tasa de gestación de las receptoras.

Lee, Hwang y Yoon (2007) realizaron un estudio en programas comerciales de superovulación de embriones en Hanwoo (Ganado de carne nativo de Korea) para estudiar los efectos de la somatotropina bovina recombinante (BST) – utilizando 500 mg al inicio de la Inseminación Artificial – en la concentración hormonal de plasma, la calidad embrionaria, y la tasa de preñez, las variables fueron examinadas durante la superovulación y sincronización en vacas donantes y receptoras. Los animales fueron tratados con un dispositivo CIDR, combinado con bST (CIDR + BST) o sin la bST (CIDR) como vacas donantes. Los embriones que se obtienen de donantes fueron trasladados en novillas receptoras Holstein tratadas con BST (CIDR + BST) o sin la bST (CIDR) para la sincronización. La correlación entre IGF-I y P4 mostró un patrón positivo en el grupo CIDR + bST ($r = 0,44$, $p < 0,01$), pero un patrón negativo se muestran en el grupo CIDR ($r = -0,59$, $p < 0,02$) en el día 7 del ciclo estral. Aunque el número de embriones que se obtienen, transferibles y degenerado no fue diferente, la cantidad de embriones Grado 1 (excelente) en el grupo de CIDR + bST fueron significativamente mayores que las del grupo CIDR ($p < 0,01$).

Del mismo modo Hasler, Bilby, Collier, Denham y Lucy (2003) también en programas comerciales evaluaron el efecto de la somatotropina recombinante bovina en la respuesta superovulatoria y en la tasa de preñez de receptoras. En el primer experimento: vacas donadoras sometidas a tres ciclos de superovulación controlada (2 antes y uno después del destete) y subsecuentemente de una cuarta superovulación mientras eran tratadas con rbST

(500 mg) o con excipiente una vez cada 14 días. En el segundo experimento: vacas donadoras lactantes sometidas a superovulación controlada y luego sometidas a superovulación mientras lactaban y eran sometidas a tratamiento de rbST (500 mg) o excipientes. El tercer experimento receptoras de embriones que fueron implantadas tanto con embriones producidos *in vitro* como *in vivo* recibieron un tratamiento de rbST o excipiente al momento de la transferencia. Los tratamientos de rbST en donadoras lactantes y no lactantes durante superovulaciones repetidas no afectó ni el número de cuerpos lúteos, ni la suma de embriones transferibles, embriones degenerados u óvulos infertilizados, ni el número de embriones transferibles. Los tratamientos en receptoras no afectó las tasas de preñez tanto para embriones producidos *in vitro* como *in vivo*.

En un artículo de revisión científica realizado por Velásquez, Zaraza, Oropeza, Webb y Niemann (2009) sobre el rol del Factor Parecido a la Insulina (Insuline Growth Factor Type 1 -IGF1) en la producción *in vivo* de embriones bovinos de donadoras superovuladas, se enfatiza que existe evidencia convincente de que el IGF1 puede afectar positivamente la producción y viabilidad de embriones de vacas superovuladas y que existe asociación entre el uso de rbST y el incremento de las concentraciones de IGF1 en el fluido folicular y el plasma periferal. Se señala que debido a los tratamientos con rbST fueron encontrados en varios experimentos incrementos estadísticamente significativos en las tasas de ovulación en términos de números de cuerpos lúteos y viabilidad embrionaria. La variabilidad entre experimentos podría estar relacionada a diferentes factores incluyendo la dosis de rbST, el método de examinación ovárica, tipo y dosis de gonadotropina, y tanto el número como la condición corporal de los animales usados en tales estudios.

Barrera, Fernández, Mixan, Rengifo y Mellisho (2013) llevaron a cabo un experimento para evaluar el efecto de 500 mg de somatotropina bovina (rbST), realizando la aplicación a la primera inseminación artificial, sobre la respuesta superovulatoria (número de estructuras recuperadas y embriones viables) en donadoras bovinas. El número de estructuras recuperadas (ovocitos no fertilizados más embriones en general) y embriones viables fue de $9,42 \pm 4,89$ y $4,05 \pm 2,34$ para el grupo control ($n=24$), versus $9,65 \pm 7,62$ y $5,55 \pm 5,25$ para el grupo rbST ($n=24$). Para el análisis de datos se utilizó un diseño en bloques con error de muestreo y la prueba de ji cuadrado. Se observó resultados superiores ($p < 0,05$) de embriones viables para las vacas tratadas con 500 mg de rbST. También se observó que la rbST tiene

influencia en el estado embrionario, siendo la proporción de embriones blastocistos superior en vacas tratadas con rbST versus las vacas control.

Guzella (2014) evaluó el efecto de dosis reducida de rbST (333 mg) asociado con el protocolo de superovulación de donadoras no lactantes, en producción y fertilidad de embriones después de la transferencia en receptoras lactantes. 267 donadoras fueron sujetas a un protocolo de superovulación y subdividas en 3 grupos: CONT (grupo control = no recibieron rbST), rbST/IA (grupo que recibió una dosis de rbST al día de la IA) y rbST/InIA (grupo que recibió dos dosis de rbST, una al inicio del protocolo y otra al momento de la IA). La concentración sérica de IGF-1 en donadoras el día de la colecta fue alto ($p < 0.0001$) para el grupo rbST/IA ($306,4 \pm 13,0$) y grupo rbST/InIA ($307,3 \pm 12,4$) con relación al control ($195,8 \pm 13,3$). Una dosis única de rbST al momento de la IA incrementó la proporción de embriones transferibles por colecta (69,9%) comparada con el control (54,7%) y los animales que recibieron dos dosis de rbST (55,8%).

En otro estudio llevado a cabo en la Universidad Autónoma de Chapingo por González, Rangel y Rodríguez (2015) se evaluó el efecto de aplicar una versus dos inyecciones de 500mg de rbST a novillas Holstein donadoras de embriones sobre la incidencia de celo (IE), diámetro del folículo preovulatorio de mayor tamaño (dLPF), respuesta superovulatoria (SR), producción de embriones y tasa de concepción en vacas Holstein receptoras de embriones (PRR). Se llevaron a cabo dos programas de superovulación: 1) rbST-I, n=5: las novillas recibieron una inyección de rbST el día cero (día de remoción del CIDR); 2) rbST-II, n=5: las novillas recibieron la primera inyección el día -8 y la segunda el día cero. Treinta y ocho vacas fueron utilizadas como receptoras, las mismas que recibieron un embrión proveniente de cada tratamiento. Como resultado se obtuvo que la aplicación de una o dos inyecciones de rbST no afectó ($p > 0,05$) la PRR, dLPF, IE ni la SR. El número de ovocitos fue mayor ($p < 0,05$) en el tratamiento rbST-I ($1,3 \pm 0,4$ vs $0,2 \pm 0,2$), el número de embriones degenerados ($1,0 \pm 0,5$ vs $4,5 \pm 3,0$) o transferibles ($1,0 \pm 0,5$ vs $1,4 \pm 0,7$) no fue diferente ($p > 0,05$) entre las vaquillas del tratamiento rbST-I y rbST-II. Además, del 36,8% de donadoras de ambos tratamientos no se colectó ningún ovocito o embrión. Se concluyó que: la aplicación de 500 mg de rbST los días -8 y cero del protocolo de sincronización de la onda folicular no incrementó la respuesta superovulatoria pero redujo significativamente el número de ovocitos recolectados de vaquillas Holstein superovuladas.

2.2. Fundamentaciones

2.2.1. Aspectos de la fisiología reproductiva

La reproducción comprende una serie de eventos que comienzan con la diferenciación de los órganos reproductivos en la etapa embrionaria y culminan con el desarrollo de la capacidad reproductiva en la pubertad, momento en el cual el individuo alcanza su madurez fisiológica y es capaz de producir gametos (masculino o femeninos) fértiles. (Vélez, Hincapié, Matamoros y Santillán, 2002, p.127)

2.2.1.1 Ciclo estral y su regulación

La reproducción en la hembra se caracteriza por la repetición de períodos de actividad o de receptividad sexual y periodos de reposo. El ciclo sexual o ciclo estral, se define como el intervalo de tiempo existente desde el comienzo de un periodo de celo hasta el comienzo del siguiente, siendo el ciclo menstrual el intervalo entre dos modificaciones uterinas (este último típico en la mujer, con una duración de 28 días) y no entre dos celos. (Caravaca et al., 2005, p.65)

“El lapso entre dos ovulaciones se denomina el ciclo estral. En las vaquillas este ciclo dura en promedio 20 días y en las vacas 21 días. En el ciclo estral se distinguen cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro” (Vélez et al., 2002, p.133).

“El ciclo estral de la vaca tiene una extensión media de 21 días. El estro dura aproximadamente 18 horas y la ovulación tiene lugar 15 horas después de la finalización del mismo” (Hincapié y Pipaon, 2003, p.34).

El día cero del ciclo estral es el día del celo, signo visible a simple vista; sin embargo desde el punto de vista fisiológico, la descripción se realizará a partir de la lisis del cuerpo lúteo y finalizará en la lisis siguiente. (Palma, 2001, p.42)

El ciclo estral de la vaca está controlado por una compleja interrelación neuroendócrina, coordinada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero y mecanismos intraováricos que establecen una dinámica folicular que permite obtener un folículo maduro capaz de ovular en el momento adecuado y producir así, una célula capaz de ser fecundada. (Palma, 2001, p.52)

En el ciclo estral se distinguen dos fases, una *fase folicular o estrogénica* y una *fase luteínica*, que constituye dos tercios de la duración total del ciclo estral. La fase folicular consta a su vez de dos fases (*proestro y estro*) y la fase luteínica de otras dos (*metaestro y diestro*). (Caravaca et al., 2005, p.66)

a. Proestro

“Constituye el comienzo del ciclo, en el cual se inicia el crecimiento y la maduración de uno o varios folículos ováricos. Conforme los folículos van creciendo van secretando hormonas y van preparando el aparato reproductor para el estro” (Caravaca et al., 2005, p.66). “Este periodo, cuya duración es de 3 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación de celo” (Palma, 2001, p.42).

Comienza con la destrucción y reabsorción del cuerpo lúteo, los niveles de progesterona descienden bruscamente eliminándose su influencia negativa sobre la liberación de gonadotropinas. Esto da lugar a un desarrollo folicular rápido, el cual aumenta a su vez la producción de estradiol, que induce una mayor producción de FSH, produciéndose un efecto de cascada que hace que los folículos en desarrollo aumenten de tamaño. Finalmente uno de ellos toma el liderazgo y se convierte en el folículo ovulatorio. (Vélez et al., 2002, p.133)

b. Estro o celo.

Es el periodo de receptividad de la hembra al macho, caracterizado por las manifestaciones de *celo*. Es en este momento cuando se produce la ovocitación o rotura del folículo y la formación del cuerpo lúteo o amarillo. La duración del celo y el momento en que se producen la ovocitación dependen de la especie animal. (Caravaca et al., 2005, p.66)

“El celo es inducido por los estrógenos producidos por el folículo. Es el periodo durante el cual la hembra acepta al macho y dura un máximo de 18 horas en ganado europeo y 12 horas en el Cebú” (Vélez et al., 2002, p.133).

Los animales en celo se muestran intranquilos, con un gran incremento de la actividad motora, generalmente disminuyen el consumo de alimentos y por otra parte buscan activamente a sus compañeros de rebaño o grupo con los que contactan hetero u homosexualmente. Los intentos de monta por parte de las hembras en celo se acompañan de

tolerancia a los intentos de monta de otras hembras o machos. (Villena y Jiménez, 2006, p.294)

“Durante este periodo la maduración del folículo ovulatorio continúa y la producción de estradiol alcanza su máximo. Los altos niveles de estradiol causan una liberación súbita de LH que prepara el folículo para la ovulación” (Vélez et al., 2002, p.133).

c. Metaestro

“Corresponde al periodo de crecimiento del cuerpo lúteo que se instaura después de la ovocitación” (Caravaca et al., 2005, p.66).

Es un periodo de 3 a 4 días posteriores al estro. El nivel de estrógenos desciende dramáticamente debido a la luteinización del folículo y a la ruptura del mismo durante el proceso de ovulación, el cual ocurre entre 6 y 10 horas después de terminado el celo. La producción de LH continúa y a pesar de que no alcanza la concentración de la fase preovulatoria, su liberación episódica es suficiente para inducir la luteinización del folículo deisente y convertirlo en un cuerpo lúteo capaz de mantener la producción de progesterona para mantener la preñez en caso de que la hembra haya concebido. (Vélez et al., 2002, p.133)

“Si hay fecundación la fase metaéstrica continúa a lo largo de toda la gestación. Si no ha habido fecundación el cuerpo amarillo regresa pasando a convertirse en cuerpo albicans (o cuerpo blanco)” (Caravaca et al., 2005, p.66).

d. Diestro

“Representa generalmente la fase más larga del ciclo y se corresponde con un período de inactividad sexual. Esta fase va desde la madurez del cuerpo amarillo o lúteo hasta su desaparición, denominada normalmente regresión” (Caravaca et al., 2005, p.66).

Esta fase dura 12 a 15 días. Se caracteriza por un cuerpo lúteo maduro y un nivel alto de progesterona en la sangre, que induce un período de quietud en el útero que promueve la implantación del embrión. Luego, éste envía una señal (proteína tropoblástica bovina) que impide la destrucción del cuerpo lúteo y lo perpetua hasta el final de la gestación. (Vélez et al., 2002, p.133)

2.2.1.2. Dinámica Folicular

Según Hincapié y Pipaon (2003), en el proceso de desarrollo folicular se producen tres fases o pasos esenciales que han sido denominados: reclutamiento, selección y dominancia.

Reclutamiento:

“La fase de reclutamiento esta dada por el desarrollo de una cohorte de folículos que comienza a madurar bajo un aporte adecuado de gonadotrofinas que le permitan avanzar hacia la ovulación” (Palma, 2001, p.50).

Estimulación de una oleada de desarrollo folicular y caracterizada por la dependencia absoluta a la influencia de las gonadotropinas, especialmente a la FSH. El diámetro de los folículos es de 4-5 mm y la cantidad de involucrados en este proceso o fase es de 5-6 folículos. (Hincapié y Pipaon, 2003, p.20)

Se han invocado factores intraováricos estimulados por la FSH, los que están involucrados en el proceso de reclutamiento folicular, los factores de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) y las proteínas a las que éstos se ligan han sido implicados en la amplificación de la acción de la FSH (Hincapié, Campo y Blanco, 2005, p.48)

Selección:

El proceso de selección se caracteriza por el bloqueo ejercido por el folículo más desarrollado sobre los restantes folículos de la misma cohorte de desarrollo, este efecto se produce a través de sustancias hormonales como las inhibinas y el estradiol, las que actúan disminuyendo la liberación de FSH, de modo que los niveles insuficientes de gonadotropinas afectan esencialmente, el desarrollo de los folículos más pequeños (Hincapié et al., 2005, p.48)

“La fase de selección, es el proceso por el cual un folículo evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación” (Palma, 2001, p.50). El otro mecanismo que se invoca es el de los factores paracrinos, como el de la producción del factor de crecimiento epidermal (EGF) que reduce la capacidad de los folículos pequeños para utilizar los andrógenos (Hincapié y Pipaon, 2003, p.20)

Dominancia

“La fase de dominancia, es el proceso por el cual el folículo seleccionado ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este folículo dominante alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás” (Palma, 2001, p.50).

Se refiere al desarrollo de un folículo, mientras los restantes sufren un proceso de atresia fisiológica. El folículo dominante es más sensible a la acción de las gonadotropinas que los restantes, por lo que a pesar de influir negativamente en la liberación de gonadotropinas FSH, no sufre de atresia, esto lo favorece también el Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina (FCPI) (Hincapié y Pipaon, 2003, p.20)

2.2.1.3. Ovulación

Según Hincapié et al. (2005) se han propuesto diversos modelos teóricos relacionados con el proceso de la ovulación (ovocitación) desde los más antiguos de tipo mecánico o físico, pasando por el enfoque endócrino-nervioso hasta los que dedican una atención preferencial a los procesos de tipo enzimático, el proceso se explica a continuación:

“Aumento de la vascularización de toda la pared folicular, excepto en el ápice del mismo donde se produce una zona avascular, representando el lugar por donde se romperá el folículo” (Hincapié y Pipaon, 2003, p.21).

“Disociación de las células de la granulosa, lo que causa un adelgazamiento notable del grosor de la pared folicular” (Hincapié et al., 2005, p.50).

“Disociación también de las células que conforman el cumulus oophorus liberándose el ovocito del macizo celular ovígero” (Hincapié y Pipaon, 2003, p.22).

La vascularización folicular preovulatoria condiciona los cambios edemáticos en la teca externa folicular y con ello se afecta la cohesión celular de la misma. Participa además una fuerte acción enzimática (colagenasa, fundamentalmente) que destruye la elasticidad del folículo representada, principalmente, por la teca externa (Hincapié et al., 2005, p.50)

“En el ápice del folículo, aparecen las células epiteliarias, los lisosomas que son sus hidrolasas destruyen las células de la túnica albugínea y las de la teca folicular” (Hincapié y Pipaon, 2003, p.22).

“La pared folicular se prolapsa cónicamente produciéndose determinados abombamientos, conocidos comúnmente como estigma de ovulación, lugar por donde se romperá la pared folicular” (Hincapié et al., 2005, p.50).

La ovulación ocurre en cualquiera de los bordes y/o caras del ovario. Después de la ovulación el folículo se transforma en el cuerpo amarillo o cuerpo lúteo, el cual forma un relieve o protuberancia en la superficie del ovario (Vélez et al., 2002, p.130)

2.2.2. Tratamiento superovulatorio.

2.2.2.1. Principios del tratamiento.

El programa de transferencia embrionaria puede ser desarrollado en centros de transferencia o directamente en el establecimiento donde se encuentran las donantes. Existen opciones intermedias, por ejemplo, que las donantes se encuentren en un centro donde se efectúa la recolección de los embriones y las receptoras en un campo cercano donde se llevan a cabo las transferencias. La organización del programa es diferente en cada una de estas circunstancias. En todos los casos, comienza con la selección de las donantes y finaliza con el diagnóstico de preñez efectuado a los 60 días post-transferencia (Palma, 2001, p.27).

“Se entiende por superovulación la liberación de un número de oocitos, superior a la tasa fisiológica de ovulación, producida por la acción de hormonas específicas administradas exógenamente” (Villena y Jiménez, 2006, p.323). “La superovulación es el estímulo hormonal del ovario para aumentar el número de folículos producidos durante el estro” (Vélez et al., 2002, p.137).

a. El tratamiento de sincronización

En los últimos años se han desarrollado algunas técnicas muy refinadas con el fin de inducir el estro durante el período de inactividad ovárica que muestran algunos bovinos de forma estacionaria, o también con el fin de precisar el momento de la ovulación para poder mejorar los índices de preñez después de practicar la inseminación artificial única (Villena y Jiménez, 2006, p. 309).

Una forma de sincronizar el celo en las donantes es mediante la administración de PGF2 α o sus análogos sintéticos. Otra forma es prolongar la fase luteal de manera artificial mediante la administración de progesterona o progestágenos, esta opción es la más utilizada actualmente dado que permite comenzar el programa independientemente de que las donantes tengan un cuerpo lúteo funcional (Palma, 2001, p.27).

- ***Progesterona***

La progesterona (P4) se forma en el cuerpo lúteo y en la placenta (donde alcanza gran importancia en algunas especies al final de la gestación). También se produce progesterona en pequeñas cantidades en la corteza adrenal, probablemente por constituir un intermediario de los corticoides adrenales (Hincapié y Pipaon, 2003, p.101).

“Prepara el endometrio para la implantación y mantenimiento de la preñez, lo cual aumenta la actividad de las glándulas secretoras en el endometrio e inhibe la movilidad del miometrio” (Hafez y Hafez, 2002, p.43).

Cuando la sincronización de celos en las donantes se efectúa con progesterona o progestágenos, generalmente se utilizan dispositivos intravaginales o implantes subcutáneos. En el primer grupo se incluyen PRID®; CIDR® y esponjas y en el segundo al Syncromate B® y al Crestar®. Si bien no tiene aplicación desde el punto de vista práctico, la progesterona también puede ser inyectada diariamente durante un periodo de 9 días (Palma, 2001, p.28).

- ***Progestágenos.***

Tienen una función o efecto similar a la progesterona natural. Suprimen la liberación de gonadotropinas y, por tanto, la maduración folicular hasta que se suspenda la administración del progestágeno, momento en el que se provoca la salida y sincronización del celo en las hembras tratadas. De esta forma se puede controlar el ciclo estral de forma artificial (Caravaca et al., 2005, p.92).

“Estos esteroides simulan la fase luteal del ciclo durante su administración e inhiben el feed back positivo del estradiol sobre la descarga ovulatoria de LH” (Villena y Jiménez, 2006, p. 307).

Progesteronas naturales o sintéticas (Norgestomet). Emulan el diestro y se usan en forma de implantes o con inyecciones. El retiro de éste tratamiento emula la destrucción del cuerpo lúteo y cesan los efectos negativos de la progesterona sobre la liberación de gonadotropinas (FSH, especialmente), promoviendo así, el crecimiento folicular y consecuentemente la presentación del celo. Este tratamiento puede ser usado en vacas en el periodo de anestro post parto. (Vélez et al., 2002, p.137)

- ***Prostaglandinas.***

Las funciones de las prostaglandinas en la reproducción de la hembra son las siguientes: En la hembra cíclica, si no ha habido fecundación y, por lo tanto, no hay embrión que se fije a la pared uterina (nidación), entonces el útero produce $PGF2\alpha$ que vía sanguínea llega al ovario y produce la regresión del cuerpo lúteo. Si la hembra ha sido fecundada y hay nidación del embrión no se produce este efecto luteolítico. Al final de la gestación, el aumento de los estrógenos producidos en la placenta estimula la síntesis de $PGF2\alpha$ a partir del endometrio. Estas PGs inducen la luteólisis y el incremento de las contracciones miométriales durante el parto (Caravaca et al., 2005, p.92)

La $PGF2\alpha$ es una de las hormonas más utilizadas en la ganadería intensiva, para la sincronización del estro entre receptoras y donantes en los programas de transferencia de embriones, siendo las causas fundamentales de fallos de respuestas a la $PGF2\alpha$ los errores en el diagnóstico de cuerpo lúteo funcional y una deficiente detección de estros, lo que está influido a su vez por el sistema de manejo de los animales (Hincapié y Pipaon, 2003, p.111)

“Estos fármacos solo pueden ser utilizados eficazmente en animales con un cuerpo lúteo funcional presente. Es posible administrar estas hormonas solas, o conjuntamente con tratamientos progestativos cortos” (Villena y Jiménez, 2006, p.307).

Se basan en el mismo principio (progestágenos), pero este tratamiento se limita a hembras que están ciclando y presentan un cuerpo lúteo. Se usa la PGF2 α (o uno de sus análogos), que causa la disolución del cuerpo lúteo y el celo 48 horas después. Como la acción de la PGF2 α depende de la presencia de un cuerpo lúteo funcional, es necesario controlar el celo. Para sincronizar todo el hato son necesarios dos a tres aplicaciones de PGF2 α (Vélez et al., 2002, p.137)

“Durante el tratamiento de superovulación, independientemente de la gonadotrofina que se emplee, a las 48-72 horas de haber comenzado la inducción se debe administrar la prostaglandina F2 α (PGF2 α) o alguno de sus análogos sintéticos” (Palma, 2001, p.85).

- ***Detección de celo***

En los programas de transferencia embrionaria, la detección de celos se efectúa generalmente empleando el método visual, realizando 3 observaciones diarias (mañana, mediodía, tarde) de una duración mínima de 30 minutos. La donante presenta celo generalmente 48h después de la primera administración de la PGF2 α . Se efectúan 2 inseminaciones, la primera 8-12 h del comienzo del celo y la segunda 12 h después de la primera (Palma, 2001, p.28)

- **Estimulación ovárica y superovulación.**

Se denomina superovulación al aumento del número fisiológico de ovulaciones propio de la especie, provocado mediante la administración de gonadotrofinas. En el bovino, se considera que hubo respuesta al tratamiento cuando se producen más de dos ovulaciones. La superovulación debe complementarse con un régimen óptimo de inseminación artificial, utilizando semen de muy buena calidad (Palma, 2001, p.79)

Luego de la presentación del celo natural o inducido (día 0 –cero-), el tratamiento de superovulación puede comenzar indistintamente entre los días 8 y 12 del ciclo estral. Es decir que, la inducción puede comenzar en el mismo momento en aquellas donantes en las que la diferencia entre sus días 0 no sea mayor de 4 días (Palma, 2001, p.28)

- ***Gonadotrofinas***

La inducción a la superovulación se efectúa principalmente con gonadotrofina sérica de yegua preñada -PMSG- o con extractos de pituitaria porcina que generalmente se conocen como FSH-p, pese a que en muchos casos contienen mayor cantidad de hormona luteinizante -LH- que de hormona foliculoestimulante -FSH- (Palma, 2001, p.79).

PMSG o GnRH, administrados al final de los tratamientos progestativos, con el fin de regular el momento de la ovulación, adelantar la pubertad, o inducir la ovulación durante la lactancia (Villena y Jiménez, 2006, p.307).

Hormona liberadora de Gonadotropina. En este caso se aplica Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH; o uno de sus análogos como Conceptal, Ovalyze o Fertagyl), que causa la liberación de la hormona LH, seguido de la aplicación de PGF2 α seis a siete días después. La GnRH induce la ovulación del folículo de mayor tamaño (dominante) (Vélez et al., 2002, p.137).

La PMSG debido a su elevado peso molecular no atraviesa el filtro renal y por lo tanto, tiene larga vida media en sangre. Esto permite inducir superovulación en la hembra bovina mediante la administración de una dosis única (2000 – 3000 UI) entre los días 8-14 del ciclo estral (Hincapié y Pipaon, 2003, p.112)

- ***Hormona Folículoestimulante (FSH)***

Es una glucoproteína, que vía sanguínea llega al ovario o al testículo, donde produce los siguientes efectos: En la hembra, estimula el crecimiento y maduración de los folículos ováricos y la producción de estrógenos por éstos. Por sí sola no puede producir la ovocitación, pero prepara al ovario para la acción de la LH. En el macho, la FSH puede actuar sobre las células germinales estimulando las primeras fases de la espermatogénesis y además estimula la función de las células de Sertoli, induciendo la síntesis de una proteína específica transportadora de andrógenos (PLA) y la producción de algo de estradiol a partir de la testosterona (Caravaca et al., 2005, p.86)

Es una glicoproteína sintetizada por las células basófilas de la hipófisis anterior. Su vida media en sangre es de unas cinco horas, por lo que su principal utilización es en los

tratamientos superovulatorios con aplicaciones cada doce horas. La FSH porcina es la gonadotropina más empleada en el presente y en el pasado con este fin (Hincapié y Pipaon, 2003, p.98) en la superovulación de hembras bovinas (Palma, 2001, p.80)

La hormona foliculoestimulante promueve el crecimiento y la maduración del folículo ovárico o folículo de Graaf. La FSH no causa la secreción de estrógeno del ovario por sí sola, sino que necesita la presencia de LH para estimular la producción de estrógeno. (Hafez y Hafez, 2002, p.38) “La FSH se puede acompañar con dosis reducidas de la hormona luteinizante (LH), para simular aún más el nivel de hormonas en un ciclo estral normal” (Vélez et al., 2002, p.137).

Las altas dosis de FSH (400mg) incrementan la respuesta de la superovulación (16.8 vs 12.9 folículos > 8mm); sin embargo, el número (2.3 vs 3.3) y porcentaje (38 vs 60%) de embriones transferibles no difieren entre altas y bajas dosis de FSH. Adicionalmente, bajando la dosis de FSH a 200 mg decrece el número de óvulos no fertilizados (1.6 vs 0.6). Esto, optimizando el nivel hormonal durante Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) o Superovulación (SOV) puede mejorar el éxito con estos protocolos (Sartori, R., Baruselli, P., Souza, A., Cunha, A. y Wiltbank, M. 2008. p.194)

Folltropin ®-V: Es un extracto altamente purificado. Se presenta liofilizado en frascos de 20 mL que contienen el equivalente a 400 mg de FSH-P1 según el estándar del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos. El producto liofilizado debe ser diluido en 20 mL de solución fisiológica estéril y apirógena, provista por el laboratorio. La solución final contiene 20 mg/mL. El laboratorio aconseja administrar 2,5 mL (50 mg) 2 veces por día durante 4 días, utilizando la vía intramuscular (Palma, 2001, p.30)

Pluset ®: Es un extracto que contiene igual cantidad de FSH y LH. La dosificación se lleva a cabo utilizando el estándar internacional de FSH y LH de orina humana. Se presenta en cajas conteniendo 2 frascos con 500 UI de FSH y LH cada uno, más un frasco de 20 ml de solución fisiológica estéril y apirógena. La solución final contiene 50 UI de FSH y 50 UI de LH/mL. El laboratorio aconseja administrar el producto 2 veces por día durante 5 días, utilizando la vía intramuscular (Palma, 2001, p.30)

Con el producto Pluset® se evidenció un mayor número de adultos con baja o nula respuesta a la superovulación, mientras que los animales jóvenes presentaron respuestas similares a

los trabajos con Folltropin®. Se evidencia que la respuesta tiende a ser mejor en animales jóvenes que en adultos con cualquiera de los dos productos teniendo en cuenta que se realizaron 116 lavados en novillas y 112 en vacas (Mogollón, E., Arcila, V., Serrano, C. y Cardona, R., 2006, p.11).

- ***Hormona Luteinizante***

La hormona luteinizante es una glucoproteína compuesta de una subunidad alfa y una beta con un peso molecular de 30.000 Dalton y una actividad biológica media de 30 min. Los niveles tónicos o basales de LH actúan conjuntamente con FSH para inducir la secreción de estrógeno del folículo ovárico grande (Hafez y Hafez, 2002, p.38).

En la hembra, uno de sus efectos más importantes es la ayuda a la maduración de los folículos en su fase final y la producción de estrógenos en el folículo maduro. Provoca la ovocitación, previa acción de la FSH. Posteriormente desencadena la formación del cuerpo lúteo y estimula la secreción de progesterona por parte de éste último. Finalmente, también estimula la actividad metabólica del ovario (Caravaca et al., 2005, p.86)

“Las concentraciones de LH son relativamente bajas durante la fase luteal del ciclo, pero una descarga formando un gran pico pre-ovulatorio se produce 24-30 horas antes de la ovulación (aproximadamente al inicio del estro)” (Hincapié y Pipaon, 2003, p.99).

2.2.3. Factores que afectan la superovulación

Aunque todos los tratamientos en mayor o menor grado son efectivos para la superovulación en los programas de transferencia de embriones, cada laboratorio debe tener en cuenta para escoger su protocolo de superovulación que existen factores externos como el ambiente, la alimentación, la raza, la edad, entre otros, que afectan positiva o negativamente la respuesta al tratamiento, por lo cual debe tenerse en cuenta este concepto para poder tomar decisiones acertadamente y obtener así óptimos resultados. (Garzón, Urrego y Giraldo, 2007, p.74)

Según Hincapié y Pipaon (2003) los factores más importantes que afectan la respuesta superovulatoria son los siguientes:

- Momento del ciclo estral de la donante.

- Categoría de la donante.
- Tipo de gonadotropina, dosis y frecuencia de la administración.
- Efecto de la edad.
- Estado nutricional y manejo de la donante.
- Efecto de los tratamientos sucesivos.
- Efecto de la raza.
- Días posparto para iniciar el tratamiento.
- Efecto estacional.

2.2.4. Lavado y colecta de embriones

Los embriones bovinos, destinados a un programa de TE pueden ser obtenidos del útero por medios no quirúrgicos. Su recolección y transferencia con éxito dependen de varios factores. En primer lugar de la vitalidad de éstos para sobrevivir y llegar a término después de ser recolectados del tracto genital, evaluados *in vitro* y transferidos a un genital receptor, con cambios de medio y temperatura. En segundo lugar, depende de que la técnica de obtención no ponga en peligro la integridad del tracto genital, a fin de poder repetirla tantas veces como sea deseable y conveniente (Palma, 2001, p.109)

“La obtención de embriones puede realizarse mediante un lavado uterino y vaginal (flushing)” (Villena y Jiménez, 2006, p.328). Los embriones se colectan de seis a ocho días después de iniciado el celo. Para ello se enjuagan los cuernos del útero por medio de un catéter de dos vías con una solución salina, de la que se recuperan luego. En los embriones se puede determinar el sexo, y se pueden dividir para aumentar aún más el número de crías. (Vélez et al., 2002, p.138)

2.2.5. Búsqueda de embriones

“Luego del lavaje por medio de las técnicas no quirúrgicas, la aislación de los embriones de los grandes volúmenes de medio se puede hacer por medio de sedimentación o filtración del medio recuperado” (Palma, 2001, p.119).

La solución conteniendo los embriones se vuelca en 5 placas de Petri de 135 mm con divisiones que permitan la completa observación visual de la superficie total de la placa. El pasaje de los embriones entre las placas se realiza con distintos tipos de capilares. Los

embriones que se encuentren se transportan a una placa de Petri pequeña (35 mm), con suero fetal entre 10-20%. Después de la evaluación y lavado de los embriones pueden ser transferidos en fresco 2-4 horas post-recolección o ser congelados para su conservación (Hincapié y Pipaon, 2003, p.134).

La sedimentación de los embriones requiere 20-30 minutos. Cumplido este tiempo se elimina el sobrenadante por medio de un tubo flexible (tipo sondas pediátricas nasogástricas) que, por capilaridad elimina lenta y progresivamente (de arriba hacia abajo) el volumen recolectado, a fin de evitar turbulencias que hagan ascender a los embriones (Palma, 2001, p.119).

Para prevenir la deshidratación, al menos 1 cm de medio debe ser retenido en el filtro para cubrir el filtro de rejilla sobre la que descansan los embriones (FAO, 1991).

“Para garantizar una completa observación visual de la superficie total de la placa, la búsqueda deberá hacerse en forma de guarda griega, tanto en el sentido de las abscisas como de las ordenadas” (Palma, 2001, p.120) (Ver Figura 1)

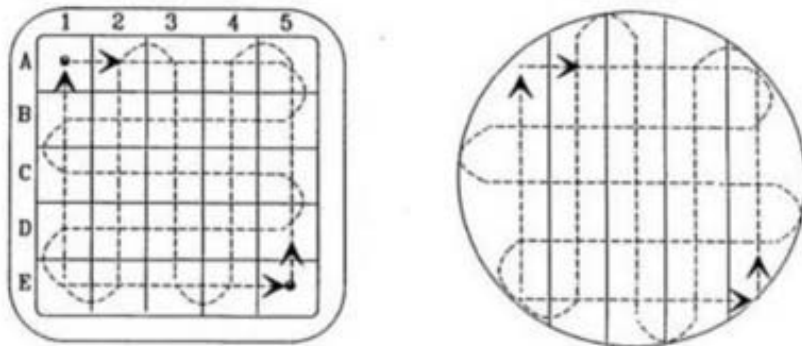


Figura 1. Procedimiento de búsqueda de los embriones (Palma, 2001, p.120)

2.2.6. Evaluación de embriones

Uno de los factores más importantes asociados con el éxito y la aplicación generalizada de esta tecnología es la evaluación de los embriones antes de la congelación y/o la transferencia a una receptora. Los embriones se suelen clasificar en base a un sistema de grado de número para su etapa de desarrollo (de 1 a 9) y por su calidad (1 a 4) (Bó y Mapletoft, 2013, p.344).

La edad del embrión es establecida a partir del día del estro (d0). Al d1 le corresponde la ovulación. De esta manera entre 24 y 36 h después de la fecundación, el cigoto de una célula se divide en 2 células ovas (d2), 24 h más tarde (d3) el embrión cuenta ya con 4 células. La división de los blastómeros puede cumplirse en forma asincrónica, razón por la cual es posible observar en estadíos tempranos un número impar de células. El intervalo entre la división más temprana y la más tardía es de alrededor de 4h. Hasta el estadio de 8 células (d4) el cigoto es transportado a través del oviducto. El día 5 aproximadamente se produce el ingreso al cuerno uterino en estadio de 16 células, momento a partir del cual es posible obtener el embrión en forma no quirúrgica y evaluarlo de acuerdo a su estadio y calidad (Palma, 2001, p.125) (Ver Figura 2)

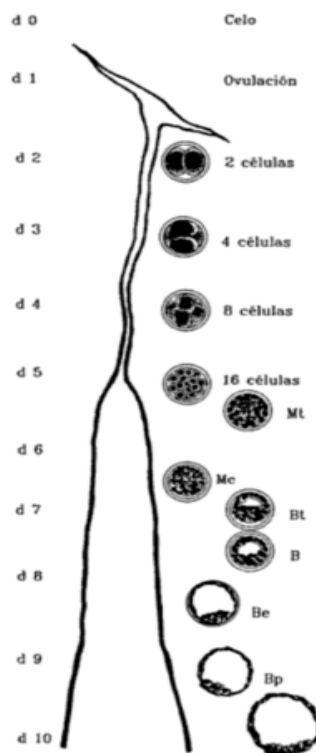


Figura 2. Desarrollo y tránsito embrionario en el tracto genital (Palma, 2001, p.127)

El Sistema de codificación normalizado para uso en la descripción de la etapa de desarrollo y calidad del embrión se describen en el capítulo 9 y se ilustran en el Apéndice D del Manual de la IETS. El código para el estado de desarrollo es numérico, que van desde "1", un ovocito no fertilizado o un embrión de células 1 a "9", la ampliación de blastocisto eclosionado. Normalmente, los embriones se recolectan 7 días después del estro para la crioconservación o transferencia y las normas del Manual de la IETS para las etapas que puedan darse en ese momento se describen a continuación (Bó y Mapletoft, 2013, p.344)

ETAPAS

“Mórula temprana (Grado Etapa 3): Una masa de al menos 16 células. Blastómeros individuales son difíciles de discernir el uno del otro” (Bó y Mapletoft, 2013, p.345). “Mt. Su masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino” (Palma, 2001, p.125).

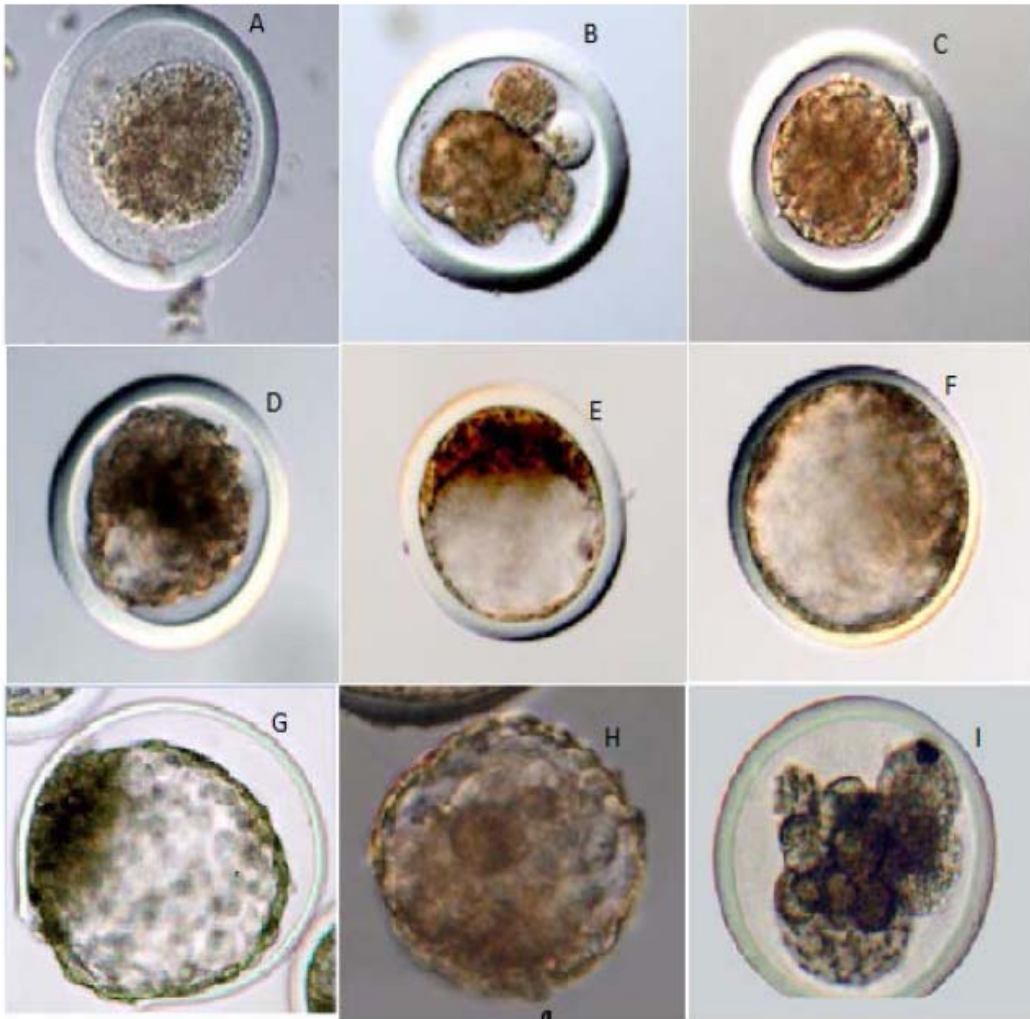
“Mórula compacta (Grado Etapa 4): blastómeros individuales se han unido, formando una masa compacta. La masa embrión ocupa 60 a 70% del espacio perivitelino” (Bó y Mapletoft, 2013, p.345). “Mc. La compactación es considerada como uno de los signos de diferenciación embrionaria, aunque los blastómeros conserven su capacidad totipotente” (Palma, 2001, p.125).

Blastocisto temprano (Grado Etapa 5): Un embrión que se ha formado una cavidad llena de líquido o blastocele y le da un aspecto general de un anillo de sello. El embrión ocupa el 70 a 80% del espacio perivitelino. A principios de esta etapa, el embrión puede aparecer de calidad cuestionable, ya que es difícil diferenciar masa celular interna de las células trofoblásticas en este momento (Bó y Mapletoft, 2013, p.345)

Blastocistos (Grado Etapa 6): diferenciación pronunciada de la capa de trofoblasto exterior y del más oscuro, masa celular interna más compacta es evidente. El blastocele es muy prominente, con el embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino. La diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna es posible en esta etapa del desarrollo. (Bó y Mapletoft, 2013, p.345) “B. Existe una marcada diferenciación entre las células del trofoblasto, que constituyen una pared –que se adosa a la zona pelúcida- y la masa celular interna (o disco embrionario) más oscura” (Palma, 2001, p.125).

“Blastocisto expandido (Grado Etapa 7): El diámetro total del embrión aumenta dramáticamente, con un adelgazamiento concomitante de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su espesor original” (Bó y Mapletoft, 2013, p.345). “Be. Los embriones recuperados en este estadio se pueden colapsar temporalmente, esto se caracteriza por una pérdida completa o parcial del blastocele” (Palma, 2001, p.126).

Blastocito eclosionado (Grado Etapa 8): Los embriones recuperados en esta etapa del desarrollo pueden someterse al proceso de eclosión o puede tener completamente arrojada la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados pueden ser esféricos con un blastocele bien definido o colapsado. La identificación de blastocistos eclosionados puede ser difícil a menos que se reexpandan cuando la aparición del anillo de sello es de nuevo evidente. (Bó y Mapletoft, 2013, p.345) “Bp. Los blastocistos protruidos (eclosionados) pueden ser igualmente transferidos, sin embargo, los embriones desprovistos de la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos, razón por la cual se acostumbra a transferir estadios de Mórula temprana a Blastocistos expandido” (Palma, 2001, p.126).



“A-Ovocito fertilizado, B-Mórula temprana, C-Mórula, D-Blastocito inicial, E- Blastocito, F-Blastocito expandido, G-Blastocito eclosionando, H-Blastocito eclosionado, I-Embrión degenerado” (Carballo, 2012, p.39).

Figura 3. “Fotos de ovocitos y embriones” (Carballo, 2012, p.39).

CALIDAD

“Existen distintas escalas de calidad embrionaria, desarrolladas por distintos equipos de trabajo. Tanto la observación per se, como la diferenciación entre un grado y otro es subjetiva y depende, en gran parte, de la experiencia del operador” (Palma, 2001, p.129).

Según Bó y Mapletoft (2013) los grados para calidad de embriones es también numérica y son basadas en la integridad morfológica de embriones. Los grados para rangos de calidad de embriones de “1” al “4” son los siguientes:

Grado 1: Excelente o bueno. Los embriones tienen una masa esférica y simétrica con blastómero individual que son uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es consistente con su esperado estado de desarrollo. Las irregularidades deberían ser relativamente menores y al menos el 85% del material celular debería ser una intacta, masa embrionaria viable. Este juzgamiento debería estar basado en el porcentaje de células embrionarias representado por el material extrusionado en el espacio perivitelino. La zona pelúcida debe ser suave y no tener superficies cóncavas o lisas que puedan causar que el embrión se adhiera a la caja Petri o a una pajuela. Los embriones de Grado 1, sobreviven bien al procedimiento de congelación/descongelación y algunos investigadores los llaman “embriones congelables”. Los embriones de Grado 1, son también aquellos recomendados para el comercio internacional (Bó y Mapletoft, 2013, p.345).

Grado 2: Regular. Estos embriones tienen irregularidades moderadas en la forma general de la masa embrionaria o en tamaño, color y la densidad de las células individuales. Al menos 50% de la masa embrionaria debe estar intacto. La supervivencia de estos embriones en el procedimiento de congelación / descongelación es menor que con embriones de Grado 1, pero las tasas de embarazo son adecuados si los embriones se transfieren frescos en receptoras adecuadas. Por lo tanto estos embriones son a menudo llamados "transferible", pero no "congelable" (Bó y Mapletoft, 2013, p.345)

Grado 3: Pobre. Estos embriones tienen importantes irregularidades en la forma de la masa embrionaria o en tamaño, color y la densidad de las células individuales. Al menos 25% de la masa del embrión debe estar intacto. Estos embriones no sobreviven el procedimiento de congelación/descongelación y los porcentajes de preñez son inferiores a los obtenidos con

embriones de calidad regular si se transfieren frescos a los destinatarios adecuados (Bó y Mapletoft, 2013, p.345).

“Grado 4: Muerto o degenerado. Estos podrían ser embriones, óvulos o embriones de 1 célula. Ellos no son viables y deben desecharse” (Bó y Mapletoft, 2013, p.345). Malo, el embrión posee muchos defectos: los correspondientes al G 3 más desarrollo retardado, sería ruptura de la zona pelúcida –el embrión puede encontrarse fuera de ella-, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o vacuolización de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y la clara degeneración. Esta categoría es considerada no transferible (Palma, 2001, p.129)



Figura 4. “Embriones bovinos: ejemplos de etapa de desarrollo y calidad. Etapas 1 a 5” (Bó y Mapletoft, 2013, p.346).



Figura 5. “Embriones bovinos: ejemplos de etapas de desarrollo y calidad. Etapas 5 a 9.”
(Bó y Mapletoft, 2013, p.347).

2.2.7. Conservación de embriones

La criopreservación posibilita almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que se pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos. Si bien los embriones son un conjunto de células, se aplican principios criobiológicos originalmente estudiados en células aisladas tales como linfocitos y fibroblastos (Palma, 2001, p.149)

2.2.8. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento se han vuelto cada vez más importantes en muchas áreas de la fisiología reproductiva. Los factores de crecimiento son polipéptidos y proteínas semejantes a las hormonas, que son predominantemente paracrinas y autocrinas en la promoción de la actividad mitogénica para la proliferación y remodelación del tejido local, por ejemplo, transformación del folículo ovárico en cuerpo amarillo. La mayor parte de la investigación en torno a los factores de crecimiento está enfocada en sus acciones promotoras de crecimiento (Hafez y Hafez, 2002, p.49)

“La administración de hormona de crecimiento –STH- antes de iniciar un tratamiento superovulatorio tiene como objetivo aumentar el número de folículos capaces de responder a las gonadotrofinas” (Palma, 2001, p.90).

2.2.9. Somatotropina bovina recombinante (rbST).

Uno de los primeros productos derivados biotecnológicamente disponible para ser utilizado en producción animal es la somatotropina Bovina (bST), que contrariamente a los esteroides es una hormona proteica. (García, 2002, p.1) “La aplicación de la somatotropina bovina recombinante (rbST) al momento de la transferencia de embriones bovinos favorece el desarrollo embrionario en vacas donadoras y mejora la tasa de gestación en vacas receptoras” (Márquez, C., 2011, p.26).

En vacas, la somatotropina bovina recombinante (rbST) se utiliza para incrementar la producción de leche. La rbST aumenta las concentraciones séricas del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I) y ambas hormonas regulan los procesos fisiológicos para incrementar la lactopoyesis. Además de sus efectos en la lactación, la somatotropina y el IGF-I favorecen la maduración del ovocito, tasa de fertilización, desarrollo embrionario

temprano, función del cuerpo lúteo y reconocimiento materno de la gestación. (Hernández y Gutiérrez, 2013, p.35). En un estudio realizado por Santos et al. (2004) en un protocolo de sincronización de estro, concluyeron que el tratamiento con rbST tiende a reducir las pérdidas de preñez en todas las vacas y mejora el mantenimiento de preñez en vacas lecheras ciclando. Sin embargo, también se observó que la rbST tendió a reducir la tasa de detección de estro en vacas multíparas y redujo el retorno al estro en vacas no preñadas lo cual extendió el intervalo entre la primera y segunda inseminación post parto.

La somatotropina recombinante bovina (rbST) ha presentado incremento en el desarrollo folicular en el ganado y algunos estudios han demostrado un incremento en la respuesta superovulatoria para vacas tratadas con rbST. (Hasler et al., 2003, p.1919). La administración de rbST al momento de la inseminación artificial, mejora el desarrollo embrionario entre vacas superovuladas e incrementa la tasa de preñez de vacas lecheras receptoras lactantes después de la transferencia de embriones. (Moreira et al., 2002, p.1385). Las tasas de preñez también se ven incrementadas cuando la rbST se administra previo a la transferencia de embriones (Hasler et al., 2003, p.1919).

Garzón et al. (2008) al final de su análisis concluyeron que el mejor resultado se obtuvo a partir de la utilización de somatotropina, ya que se encontró una reducción en la proporción de oocitos infértiles, aumento en el número de embriones transferibles, aumento en la tasa de fertilidad de las donadoras y por ende un incremento de las tasas de preñez, lo cual lleva a hacer más eficiente y rentable esta técnica.

Sin embargo, el uso de rbST en vacas donadoras en operaciones comerciales de transferencia de embriones no es una ventaja cuando las vacas son sometidas a superovulaciones repetitivas. (Hasler et al., 2003, p.1927). “La aplicación de esta hormona es recomendable solo en vacas con antecedentes de baja producción embrionaria y que al momento del tratamiento tengan balance energético positivo y una condición corporal 2 y 3 (escala 1 a 5)” (Palma, 2001, p.90).

2.2.10. Efectos del Factor de Crecimiento parecido a la Insulina Tipo 1 (IGF-1)

La administración de rbST incrementa las concentraciones de insulina y el Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina Tipo 1 (IGF-1) en plasma, incrementando el número y crecimiento de folículos antrales y esto puede incrementar la respuesta superovulatoria en vacas tratadas con rbST. (Márquez, C., Rangel, R., Rodríguez, R., Gutiérrez, C. y García, C., 2010, p.206) “La administración de somatotropina bovina recombinante provoca un aumento del número de folículos de 2 a 5mm. Este hecho sería consecuencia de un incremento de IGF-1 en el fluido folicular” (Palma, 2001, p.90).

La concentración de IGF-1 durante la estimulación gonadotrópica en folículos, oviducto y útero dependerá principalmente de la dosis y el tipo de hormona superestimuladora (SH) utilizada, el número de folículos que responderán a la FSH a la hora del tratamiento y la producción endócrina y parácrina de IGF-1 en el individuo (inherente e inducida nutricionalmente). El tratamiento estimulador inducirá alta producción de estradiol (E2), que a su vez aumentará la producción de IGF-1 en el tejido reproductivo (parácrina) y posiblemente en el plasma periperar (efecto endócrino). El incremento de IGF-1 en el plasma podría contribuir aún más al efecto parácrino de IGF-1 durante la superovulación. Esta hiperestimulación de IGF-1 se asocia con el crecimiento del folículo aumentado que ocurre durante la superovulación. En los folículos destinados a alcanzar el tamaño preovulatorio, la cantidad del Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina Ligado a la Proteína 2 (IGFBP-2), 4 y 5 se reducirá, lo que permite el incremento de las concentraciones de IGF-1 intrafoliculares. Los efectos positivos sobre la competencia de ovocitos y el desarrollo embrionario se ejercen por IGF-1 cuando las concentraciones se mantienen dentro del rango fisiológico normal (flechas verdes). Si la respuesta superestimuladora es demasiado alta, las concentraciones de IGF-1 se incrementan a niveles suprafisiológicas, lo que podría dar lugar a la ovulación de ovocitos de baja calidad. La disminución de la calidad de los ovocitos y la concentración de IGF-1 alterado presente en el oviducto y el útero podrían interferir con el proceso de fertilización y/o la preimplantación del embrión desarrollado (flechas rojas). (Velásquez, Zaraza, Oropeza, Webb y Niemann, 2009, p.169)

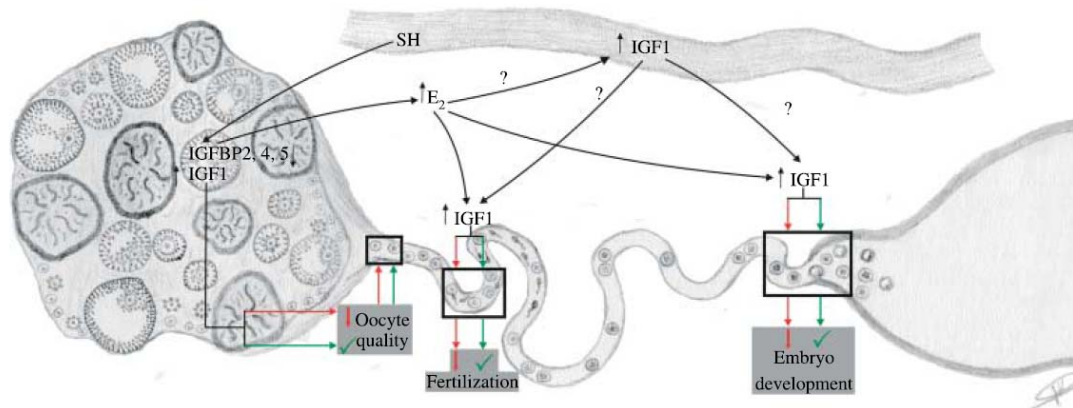


Figura 6. “Posibles efectos del IGF-1 en los ovocitos y la preimplantación del desarrollo embrionario durante la superovulación en ganado” (Velásquez et al., 2009, p.169).

“Vacas que recibieron dos aplicaciones (325 mg c/u) de rbST han incrementado las concentraciones en plasma de hormona de crecimiento (GH) y de IGF-1 por cuatro semanas y se incrementó la fertilidad. Mientras que vacas que recibieron una única dosis (325 mg) de rbST han incrementado las concentraciones de GH y de IGF-1 por tan solo dos semanas, lo cual fue insuficiente para alterar la fertilidad” (Ribeiro et al., 2014, p.1). “La aplicación de rbST incrementó las concentraciones de insulina e IGF-1 en donadoras Charolais mejorando la respuesta a la superestimulación” (Máquez, 2011, p,26).

2.2.11. Ultrasonografía reproductiva

La ultrasonografía transrectal se ha convertido en una útil herramienta en la reproducción animal desde su implementación en la década de 1980. Su uso abarca desde el campo clínico hasta estudios fisiológicos, pasando por numerosas aplicaciones prácticas de diagnóstico en finca (Gutiérrez & Báez, 2014, p.99).

En los últimos años la ecografía reproductiva ha alcanzado una gran importancia con el perfeccionamiento de los equipos de ultrasonografía que han permitido no solo el diagnóstico de patologías del tractus reproductivo y gestaciones en etapas precoces sino también han permitido un mejor estudio de la ciclicidad ovárica y la dinámica folicular, estos conocimientos se han utilizado para mejorar los resultados obtenidos en la respuesta

superovulatoria de las donantes utilizadas en los programas de transferencia de embriones (Hincapié y Pipaon, 2003, p.192).

La ultrasonografía es una herramienta útil para la evaluación, diagnóstico y toma de decisiones respecto a los eventos reproductivos de la hembra bovina, con potencial para ser usada en conjunto con la aplicación de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial y transferencia de embriones con el fin de optimizar su eficiencia (Gutiérrez y Báez, 2014, p.99).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sitio de estudio

La investigación se realizó en la parroquia Machachi, en la Hacienda San Carlos de Pulpito de la empresa Agrifranca-Biogensa ubicada en el cantón Mejía, provincia de Pichincha, con una altitud de 2.800 m.s.n.m. La investigación se desarrolló entre los meses de enero a abril del 2016, con una duración de 120 días.

Tabla 3.1. Condiciones meteorológicas del sitio del experimento.

| Parámetros | Valores |
|----------------------|---------|
| Temperatura Máxima | 18,1 °C |
| Temperatura Mínima | 6,2 °C |
| Temperatura Promedio | 12,2 °C |
| Precipitación | 1487 mm |
| Humedad | 81% |

* Datos tomados de la estación de Izobamba

Fuente: INAHMI, 2014

3.2. Instrumentos y recursos

Tabla 3.2 Detalle de instrumentos y recursos

| Etapa | Equipos, materiales y productos veterinarios |
|---------------------------------|---|
| 1. Preparación donante | Somatotropina recombinante bovina (Lactotropina 500 mg) |
| | Equipos de sujeción. |
| | Mandril o estilete |
| | Jeringuillas descartables |
| | Agujas descartables |
| 2. Superovulación donante | Folltropin (FSH-p 400 mg diluidos en 20 mL de solución fisiológica) |
| | Progesterona (CIDR 1,9 g) |
| | Prostaglandina (Estrumate 500 µg cloprostenol) |
| | Materiales generales de asepsia. |
| | Jeringuillas descartables |
| 3. Colecta embriones | Agujas descartables |
| | Registros de observación. |
| | Ecógrafo marca KOLING |
| | Transductor Multifrecuencia 5 a 10 MHZ |
| | Computador portátil |
| | Sonda + cateter Foley (Bioniche) |
| | Sonda de doble vía en Y |
| | Medio de lavado PBS (Solución salina fosfatada buferada) |
| | Suero fisiológico |
| | Guantes ginecológicos |
| | Dilatador cervical |
| | Amonio Cuaternario |
| | Lidocaína (anestésico) |
| | Silasina |
| | Papel Toalla |
| Frasco colector | |
| 4. Análisis de embriones | Estereoscopio |
| | Placa térmica |
| | Filtro para embriones bovinos |
| | Micropipetas |
| | Puntas de pipetas |
| | Placa Petri |
| | Placas esfera de reloj |
| 5. Congelación / Almacenamiento | Congeladora de embriones |
| | Pajillas irradiadas para conservación |
| | Medio Holgind (medio de mantenimiento) |
| | Medio de congelación (Etilenglicol) |
| | Nitrógeno líquido |
| | Máquina de congelación de embriones |

3.3. Diseño experimental, factores y variables de estudio

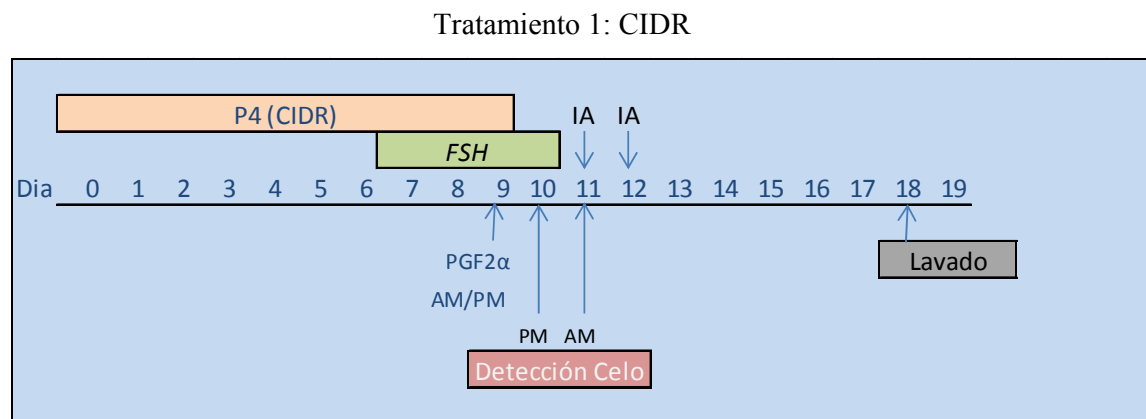
3.3.1. Tipo de diseño

En esta investigación se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se definió este diseño debido a que los animales que intervinieron cumplieron con requisitos que llevan a características equilibradas para un programa de superovulación y transferencia de embriones. Entre los requisitos tenemos:

- Excelente sanidad, libre de enfermedades y con todas las vacunas pertinentes.
- Examen ginecológico para evaluar la salud del aparato reproductivo.
- Tener una condición corporal entre 3 y 3,5
- Tener al menos 80 días post parto
- Animales de reconocido pedigrree.
- Entre 2 y 5 partos, lo que permite a sus propietarios estar seguros de que están multiplicando un buen ejemplar.

3.3.2. Número de tratamientos

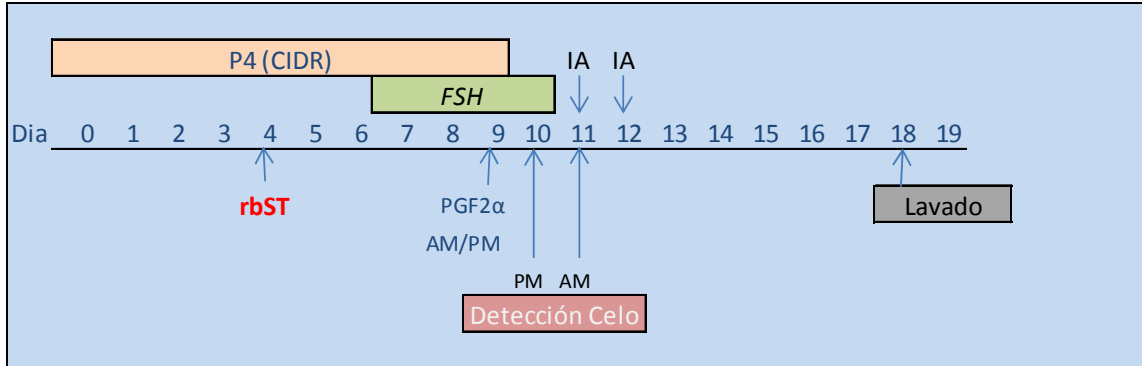
Se empleó un total de 2 tratamientos distribuidos totalmente al azar en el sitio experimental, como se presenta en los siguientes esquemas.



- FSH = 400 mg (Folltropin-V)
 P4 = 1.9 g progesterona (CIDR)
 PGF2α = 500 µg cloprostenol (Estrumate)

Figura 7. Esquema del tratamiento sin rbST

Tratamiento 2: CIDR + rbST



| | |
|---------------|--|
| FSH | = 400 mg (Folltropin-V) |
| RbST | = 500 mg (Lactotropina®) |
| P4 | = 1.9 g progesterona (CIDR) |
| PGF2 α | = 500 μ g cloprostenol (Estrumate) |

Figura 8. Esquema del tratamiento con rbST

3.3.3. Número de unidades experimentales

Se utilizó 5 unidades experimentales (5 vacas), para cada tratamiento

3.3.4. Variables de estudio

Variable independiente:

Uso de somatotropina recombinante bovina (rbST).- en el presente experimento se utilizó 500 mg de rbST por animal, aplicados 72 horas antes del inicio de la superovulación.

Variable dependiente

- Número de cuerpos lúteos
- Estructuras por vaca
- Embriones transferibles
- Embriones no transferibles (estructuras degeneradas)
- Estructuras no fertilizadas
- Etapas de desarrollo
 - Mórula
 - Blastocisto temprano

- Blastocisto
- Blastocisto expandido
- Calidad del embrión
 - Grado 1
 - Grado 2
 - Grado 3
 - Grado 4

3.3.5. Factores

El experimento estuvo influenciado por el factor somatotropina recombinante bovina (rbST), razón por la cual se trabajó con los grupos: Con STB y Sin rbST.

3.4. Método estadístico

Análisis de varianza

Tabla 3.3. Esquema del ANOVA

| Fuente de variación | Grados de libertad | | |
|---------------------|--------------------|------------|---|
| Tratamiento | t-1 | 2-1 = | 1 |
| Error | t(r-1) | 2(5-1) = | 8 |
| TOTAL | tr-1 | (2)(5)-1 = | 9 |

Análisis funcional

Se realizó una Prueba de DMS para los tratamientos. Además, se utilizó Tablas de Contingencia (prueba de Chi-Cuadrado) con un nivel de significancia exigido de $p \leq 0,05$. Para el procesamiento de la información se utilizó el software estadístico InfoStat 2015.

3.5. Manejo del experimento

3.5.1. Superovulación

La superovulación de embriones se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

- Día cero (0), colocación intravaginal del dispositivo CIDR,
- Día siete (7), se realizó la primera aplicación de la FSH, la misma que continuó hasta el día diez, en dos aplicaciones diarias 7 am y 7 pm. Se aplicó 50 mg por cada dosis (100 mg/día)
- Día nueve (9), se realizó el retiro del dispositivo CIDR y se aplicó Prostaglandina (500 µg de cloprostenol – Estrumate) en dos aplicaciones am/pm (250 µg/aplicación)
- A partir de la tarde del día diez, se inició la detección de celo hasta la mañana del día once.
- Se inició la inseminación artificial a partir de la tarde del día once y se repitió en la mañana del día doce.
- Siete días después de la primera inseminación se realizó la recolección de embriones.

El uso de la somatotropina recombinante bovina se realizó sobre el mismo protocolo descrito con la incorporación de los 500 mg de rbST, 72 horas antes del inicio de la superovulación, es decir el día 4to.

3.5.2. Lavado uterino y recolección de embriones

Para el lavado y recolección de embriones, se realizó el procedimiento aplicado por Salinas (2013). En primer lugar se ejecutó un previo chequeo ginecológico con ayuda de palpación rectal y con el ecógrafo se verificó la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios y de esta manera se tuvo la idea de cuantos embriones aproximadamente serían recuperados, ya que de antemano conocemos que por cada ovulación se forma un cuerpo lúteo; además, con la palpación rectal se estimuló la evacuación de heces al animal; luego se limpió el tren posterior del animal con abundante agua y jabón; se secó y colocó, dependiendo del tamaño del animal, entre 5 y 8 ml de anestesia sin epinefrina (Lidocaína) por vía epidural, con ello se evitó que el animal entre en estrés por el manipuleo que se realizó en el útero; como el tren posterior del animal está insensible, se ató su cola de una manera que no estorbó las labores de limpieza.

Antes del lavado se colocó el litro de Flushing (PBS modificado) a unos 50 cm más alto que la vaca y se verificó el funcionamiento de las sondas, el filtro y el matraz. El lavado inició con la introducción por la vulva del catéter Folley de dos vías, conjuntamente con un estilete para facilitar su paso por el cérvix, este catéter se ubicó en el tercio medio del cuerno uterino y se infló el balón unos 5 cm, pasado la bifurcación del útero la cantidad de aire fue de 9 a 15 ml dependiendo del tamaño de los cuernos; lo importante fue cerrar el paso para que no se escape el medio de lavado. La cantidad de líquido que ingresó fue igual a la cantidad de líquido que se recogió, por lo general se ocupó 500 ml en cada uno de los cuernos en cantidades que van de 30 – 60 ml dependiendo del tamaño del mismo hasta completar la cantidad señalada, el líquido se recogió en un matraz, previo paso por el Filtro Ecom que es el lugar donde se quedaron los embriones. Una vez que se acabó la recolección en un cuerno se realizó la misma operación para el segundo cuerno.

3.5.3. Búsqueda y Evaluación de embriones

Los embriones fueron buscados mediante el procedimiento realizado por Salinas (2013), así también la observación para la clasificación. La determinación del grado de calidad se la realizó conforme lo establece Bó y Mapletoft (2013) en los siguientes grupos: Excelente - Bueno, Regular, Malo, Muertos o degenerados.

3.5.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se utilizó la técnica de observación directa y todos los datos fueron anotados en un cuaderno. Para la toma de imágenes en el aparato reproductor de las hembras bovinas se utilizó un ecógrafo marca KOLING, con una sonda de 5.0 Hz para el monitoreo de las estructuras presentes en los ovarios, se contabilizó y se registró en el formulario establecido para el efecto. El monitoreo se realizó el día de la recolección de los embriones.

3.5.5. Manejo de Donadoras

“La selección y manejo de las donantes es uno de los puntos críticos del programa. Si estas hembras no están reproductivamente sanas y en un adecuado estado de balance nutricional el programa puede fracasar antes de haber comenzado” (Palma, 2001, p.21).

El manejo y el estado sanitario en el que se encuentran las donantes, son elementos de gran importancia en los resultados de la superovulación, dentro de los cuales la alimentación de las hembras donantes debe garantizar los requerimientos mínimos diarios de acuerdo con el estado reproductivo de las mismas, lo que depende enteramente del hombre (Hincapié y Pipaon, 2003, p.129).

Con respecto al manejo de la alimentación, los animales tuvieron acceso a pasto (*Pennisetum clandestinum*) y recibieron concentrado a razón de 0.5 libras / litro producido.

3.5.5.1. Criterios de inclusión

Los animales para poder ser parte del programa de superovulación de embriones, cumplieron con requisitos internacionales y características equilibradas que permitieron una excelente respuesta. Entre los requisitos tenemos:

- Excelente sanidad, libre de enfermedades y con todas las vacunas pertinentes.
- Examen ginecológico para evaluar la salud del aparato reproductivo.
- Tener una condición corporal entre 3 y 3,5
- Tener al menos 80 días post parto
- Son animales de reconocido pedrigree.
- Tienen entre 2 y 5 partos, lo que permite a sus propietarios estar seguros de que están multiplicando un buen ejemplar.

Los trabajos que se vienen desarrollando con esta biotecnología, requiere que se realicen en animales de condiciones y características probadas, por lo que estamos hablando de animales con características equilibradas, y es importante tener en cuenta el factor económico pues esta biotecnología es costosa.

Entonces, se utilizó 10 vacas, escogidas bajo los siguientes criterios de inclusión:

- Ganado Lechero
- Edad rango de 4-8 años, con un promedio de 2 a 5 partos
- Producción promedio de 20 litros/vaca/día, promediado en los últimos 15 días.
- Rango de días en lactancia ≥ 80 días y ≤ 120 días.
- Condición corporal ≥ 3.0 y ≤ 3.75 en la escala de 1 a 5.

3.5.5.2. Criterios de exclusión

Haber presentado trastornos (distocia o metabólico) al momento del parto.

Animales de primer parto.

3.5.6. Características de las vacas para la investigación

Conforme lo realizó Salinas (2013), previo al inicio de la investigación se procedió a monitorear ecográficamente a todas las vacas, a fin de evaluar los ovarios, para constatar de que no exista ninguna patología (quistes ováricos, ovarios atrésicos, cuerpos lúteos cavitarios); de la misma manera se evaluó: los cuernos uterinos para descartar patologías (metritis, piómetra), el cérvix para descartar traumatismos producidos en el parto y la vagina para eliminar patologías como urovagina, neumovagina entre otras.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Número de Cuerpos lúteos y estructuras recolectadas

Los resultados obtenidos en el número de cuerpo lúteos y número de estructuras/vaca no mostraron diferencias ($p>0,05$) (Anexo 1), sin embargo de no encontrarse diferencias estadísticas vale anotar que con rbST se alcanzó un mayor promedio tanto de cuerpos lúteos como de número de estructuras por vaca (Tabla 4.1).

La significancia de este trabajo es similar a la reportada por Neves et al. (2005) que indican que el uso de rbST antes de la superovulación no aumenta el número de estructuras totales recolectadas. El número de estructuras recuperadas por Barrera et al. (2013) utilizando rbST fue de $9,65\pm 7,62$ el cual es similar a lo obtenido en este experimento en el grupo rbST y también es similar a lo obtenido por Moraes (2008) de $9,50\pm 3,0$ estructuras colectadas. Sin embargo, son inferiores a lo obtenido por Márquez (2011) de $16,2\pm 7,00$ estructuras totales y a los obtenidos por Lee (2007) de $13,1\pm 2,1$ estructuras recuperadas.

Tabla 4.1. Número de cuerpos lúteos promedio y estructuras por vaca recolectadas

| Tratamiento | Cuerpos Lúteos / vaca | Número de estructuras / vaca |
|-------------|-----------------------|------------------------------|
| Sin rbST | 9,00 | 7,40 |
| Con rbST | 11,40 | 9,60 |

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p<0,05$)

La respuesta entre tratamientos es similar a lo encontrado por Hasles et al. (2003) quienes no encontraron diferencia en el número de cuerpos lúteos en donadoras lactantes y no lactantes tratadas con rbST durante superovulaciones repetidas. Sin embargo, el número de cuerpos lúteos es similar a lo reportado por Moraes (2008) que obtuvo $11,1\pm 1,9$ en el tratamiento con 250 mg de rbST.

En el estudio realizado por Márquez (2011), las concentraciones de IGF-1 e insulina antes de la aplicación de rbST fueron similares entre tratamientos ($p>0,05$), sin embargo, se incrementaron después de la aplicación de la rbST, de tal manera que para el día cuatro posterior a la aplicación fueron diferentes ($p<0,05$) y se mantuvieron altas hasta por 7 días. En el presente estudio se presume que la aplicación de rbST incrementó las concentraciones

de IGF-1, favoreciendo el ligero incremento en el número de estructuras por vaca. Aunque en este estudio no se midieron los niveles de IGF-1 en plasma diversos trabajos señalan que: el IGF-1 acelera el progreso meiótico de oocitos bovinos en pequeños folículos (≤ 3 mm) y más embriones viables pueden ser obtenidos en ovejas y ganado cuando una gran población de folículos alrededor de los 3 mm de tamaño están presentes al momento de la estimulación (Velásquez et al., 2009, p.165). “Los niveles hormonales de IGF-1 y P4 fue alto en el grupo CIDR+rbST comparado a aquellos del grupo CIDR” (Lee, 2007, p.197).

4.2. Etapa de desarrollo embrionario de las estructuras

Las estructuras obtenidas (mórulas, blastocistos y blastocistos expandido) se detallan en la Tabla 4.3. No se encontraron diferencias significativas por efecto o ausencia de la rbST para los estadios de desarrollo blastocisto y blastocisto expandido, con una $p > 0,10$. Sin embargo para la etapa de desarrollo de mórula existe diferencia significativa ($p < 0,10$) (Ver Anexo 2). “La adición de somatotropina tiene influencia en el estado de desarrollo embrionario” (Barrera, 2013, p.82). “El IGF-1 juega un rol importante en el crecimiento folicular bovino, la obtención de la competencia del ovocito y la viabilidad embrionaria” (Velásquez et al., 2009, p.161), por lo que se considera que es importante el suministro de rbST en el incremento de mórulas en relación al testigo.

Con respecto al promedio de mórulas obtenidas, se puede mencionar que Moraes (2008) obtuvo tan solo un $0,5 \pm 0,2$ en el tratamiento con rbST y $2,3 \pm 1,9$ en el tratamiento sin rbST los dos valores difieren de la respuesta en este experimento (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Número promedio de estructuras según su etapa de desarrollo.

| Tratamiento | Mórulas | Blastocisto | Blastocisto Expandido |
|-------------|---------|-------------|-----------------------|
| Sin rbST | 6,20 b | 1,00 | 0,20 |
| Con rbST | 9,60 a | 0,00 | 0,00 |

Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,10$)

En este experimento solamente se obtuvieron blastocistos en el tratamiento sin rbST por lo que no fue posible realizar el análisis de varianza. Esto difiere de lo reportado por Moreira et al. (2002), quienes obtuvieron estructuras para el estadio blastocisto y encontraron diferencias significativas. También difiere de lo reportado por Moraes (2008) quien obtuvo $4,7 \pm 1,6$ blastocistos y $0,6 \pm 0,3$ blastocistos expandidos para el tratamiento con rbST y no encontró diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los tratamientos.

Sin embargo, es importante mencionar que al establecer la Tabla de Contingencia entre tratamientos con las diferentes estructuras obtenidas no existe igual relación, entre los tratamientos en estudio, con una $X^2 = 8,37^*$, $p < 0,05$ (Tabla 4.3). Con la aplicación de rbST el 100% de las estructuras fueron mórulas; mientras que sin rbST, el 83.78% fueron mórulas, 13.51% fueron blastocitos y 2.70% blastocitos expandidos.

Tabla 4.3. Tabla de contingencia entre tratamientos para las estructuras obtenidas

| Tratamiento | Mórula | Blastocisto | Blastocisto Expandido | Total |
|-------------|--------|-------------|-----------------------|-------|
| Sin rbST | 31 | 5 | 1 | 37 |
| Con rbST | 48 | 0 | 0 | 48 |
| Total | 79 | 5 | 1 | 85 |

Chi-cuadrado = 8,37 *

4.3. Grados de Calidad de las estructuras recolectadas

Se realizó el análisis de varianza respectivo para los grados de calidad de los embriones totales recolectados (Ver Anexo 3) y no se encontraron diferencias entre los tratamientos para la calidad de embriones recolectados ($p > 0,05$), como se puede apreciar en la Tabla 4.4. Esto difiere de lo encontrado por Lee, et al. (2007) quienes obtuvieron una mayor cantidad de embriones Grado 1 (excelente) en un tratamiento utilizando rbST ($p < 0,01$). Estos resultados diferentes posiblemente se deben a la gran variabilidad de respuesta presente en nuestro estudio en las diferentes unidades experimentales de cada tratamiento, reflejadas en los altos coeficiente de variación.

Comparado a lo reportado por Moraes (2008), la respuesta fue similar al no encontrarse diferencias significativa ($p > 0,05$) entre los tratamientos con y sin el uso de rbST. Aunque los promedios obtenidos en este experimento son ligeramente mayores a los de Moraes (2008) quien obtuvo: $7,3 \pm 2,5$ Grado 1, $0,5 \pm 0,3$ Grado 2 y $0,2 \pm 0,1$ Grado 3 y ligeramente superiores a los obtenidos por Moreira et al. (2002) de $6,2 \pm 1,2$ embriones de calidad Excelente.

Tabla 4.4. Número promedio de estructuras según su grado de calidad.

| Tratamiento | Grado 1 | Grado 2 | Grado 3 | Grado 4 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|
| Sin rbST | 5,60 | 1,20 | 0,40 | 0,20 |
| Con rbST | 8,00 | 0,80 | 0,80 | 0,00 |

Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

“Los embriones de Grado 1 sobreviven muy bien al proceso de congelado/descongelado y son recomendados para el comercio internacional. Los Grados 2 y 3 pueden ser transferidos en frescos a receptoras adecuadas” (Bó y Mapletoft, 2013, p. 348), razón por la cual, todos los embriones de Grado 1, fueron congelados.

Al establecer la tabla de contingencia entre los tratamientos con las diferentes estructuras obtenidas se encontró diferente relación entre los tratamientos ya que con la aplicación de rbST el 100% de las estructuras fueron mórulas, mientras que sin rbST el 83.78% fueron mórulas, 13.51% fueron blastocitos y 2.70% blastocitos expandidos (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Tabla de contingencia entre tratamientos según su grado de calidad

| Tratamiento | Grado 1 | Grado 2 | Grado 3 | Grado 4 | Total |
|-------------|---------|---------|---------|---------|-------|
| Sin rbST | 28 | 6 | 2 | 1 | 37 |
| Con rbST | 40 | 4 | 4 | 0 | 48 |
| Total | 68 | 10 | 6 | 1 | 85 |

Chi-cuadrado = 2,81

La viabilidad de los embriones en los programas de superovulación y transferencia de embriones no solo se ve afectada por la tasa de ovulación, pero también depende la manera crítica de si se produce la fertilización normal y el oviducto y el medio uterino en el que el embrión se desarrolla antes de la recolección embrionaria. (Velásquez et al., 2009, p.167)

4.4. Grados de Calidad para la etapa de Mórula

Debido a la cantidad de embriones en estadio de mórula, se realizó un análisis estadístico de la calidad de estas estructuras encontrándose diferencia significativa ($p < 0,10$) en Grado 1, en el resto de grados de calidad no se encontró diferencias estadísticas con una $p > 0,10$ (Ver Anexo 4).

La aplicación de rbST es efectiva para incrementar el número promedio de mórulas de grado 1 (calificación excelente) con un promedio de 8.00 en relación al tratamiento sin la aplicación que apenas alcanzó 4.8 mórulas de grado excelente, diferenciándose mediante la DMS con $p < 0.05$, en el resto de grados de calidad de las mórulas los promedios son bajos y no se diferenciaron estadísticamente (Tabla 4.6).

En el estudio realizado por Lee (2007) entre los embriones transferibles, el porcentaje de embriones Grado 1 (excelente) fue significativamente superior ($p < 0,01$) en el tratamiento con rbST, obteniendo un estimado superior al 80% de esa calidad, al observar la Figura 9. Se logra apreciar un comportamiento similar, es decir un mayor número de embriones de Grado 1 y que son significativamente diferentes ($p < 0,10$) a los obtenidos sin rbST.

Tabla 4.6. Número promedio de mórulas con base en su grado de calidad.

| Tratamiento | Grado 1 M | Grado 2 M | Grado 3 M | Grado 4 M |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sin rbST | 4,80 b | 1,00 | 0,20 | 0,20 |
| Con rbST | 8,00 a | 0,80 | 0,80 | 0,00 |

Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,10$)

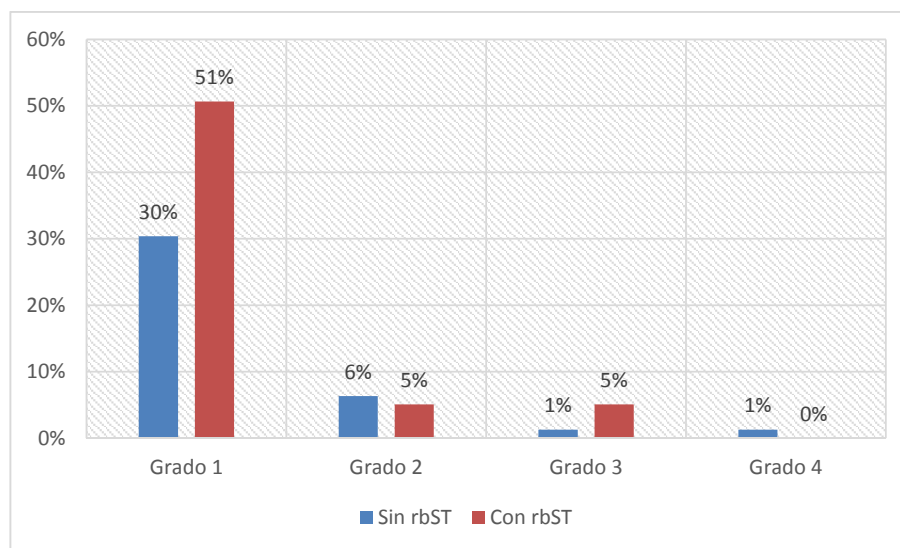


Figura 9. Efecto del tratamiento rbST sobre la calidad de mórulas.

Al establecer la tabla de contingencia entre los tratamientos con las diferentes calidades de mórulas se determinó una relación similar entre los dos tratamientos con respecto a las calidades en estudio (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Tabla de contingencia entre tratamientos para calidades de mórula

| Tratamiento | Grado 1 M | Grado 2 M | Grado 3 M | Grado 4 M | Total |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
| Sin rbST | 24 | 5 | 1 | 1 | 31 |
| Con rbST | 40 | 4 | 4 | 0 | 48 |
| Total | 64 | 9 | 5 | 1 | 79 |

Chi-cuadrado 3,41

4.5. Estructuras transferibles y no transferibles

Conforme lo describe Bó y Mapletoft (2013) la calidad 1, 2 y 3 son transferibles, la calidad 4 son estructuras no viables y deben ser descartadas, por lo tanto son estructuras no transferibles. En este trabajo no se encontraron diferencias significativa ($p > 0,10$) entre los tratamientos para el número de estructuras transferibles y las no transferibles (Ver Anexo 5).

En el tratamiento Sin rbST el porcentaje de embriones transferibles fue de 97.29% y con rbST el 100%, como se puede apreciar la diferencia es mínima (Tabla 4.8).

Esto difiere de lo encontrado por Moreira et al. (2002) que obtuvieron una respuesta mayor del porcentaje de embriones transferibles utilizando rbST versus el control sin rbST (77,2% > 56,4%; $p < 0,01$) y también difiere de lo reportado por Neves et al. (2005) quienes utilizaron rbST antes de la superovulación (4 días antes) y obtuvieron un aumento en el porcentaje de embriones viables o transferibles ($p < 0,05$). Sin embargo, es similar a lo obtenido por Lee, et al. (2007) que no encontraron diferencias entre el número de embriones transferibles y degenerados. El número de embriones transferibles fue similar $9,6 \pm 1,8$ con el tratamiento rbST.

Tabla 4.8. Número promedio de embriones transferibles y no transferibles.

| Tratamiento | Transferibles | No Transferibles |
|-------------|---------------|------------------|
| Sin rbST | 7,2 | 0,2 |
| Con rbST | 9,6 | 0 |

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Barrera et al., 2013 encontraron diferencias ($p < 0,05$) en el número de embriones transferibles utilizando rbST versus el grupo control, sin embargo, el número fue menor ($5,55 \pm 5,25$) al número obtenido en este experimento. El número también fue menor en la investigación realizada por González, et al., 2015 en vaquillas superovuladas utilizando rbST ($1,0 \pm 0,5$ vs $1,4 \pm 0,7$) en tratamiento con una o dos dosis de rbST.

Moraes (2008) obtuvo $1,0 \pm 0,5$ embriones degenerados o no transferibles diferentes de este experimento en que todos los embriones son viables, el número de embriones transferibles también fue menor ($8,1 \pm 2,6$).

La proporción de embriones transferibles en este experimento utilizando rbST fue del 100%, lo cual difiere de lo reportado por Guzella (2014) quien utilizó dosis reducida de rbST (333 mg) el día de la IA y obtuvo 69,9% de embriones transferibles por colecta. “La aplicación de somatotropina bovina recombinada tiene efecto favorable sobre el estado de desarrollo embrionario temprano e incrementa el número de embriones viables” (Barrera, 2013, p.82).

En vacas Charolais superestimuladas se observó un incremento ($p < 0,09$) en el número de embriones transferibles (ET), embriones degenerados (ED) ($p < 0,05$) en un trabajo reportado por Márquez (2011) cuando adicionó rbST. Sin embargo es diferente a lo obtenido en este trabajo porque obtuvo $6,9 \pm 4,25$ y $6,3 \pm 5,39$ embriones transferibles y no transferibles respectivamente.

Al establecer la tabla de contingencia entre tratamientos con respecto a los embriones transferibles y no transferibles, se determinó una similar relación (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Tabla de contingencia para embriones transferibles y no transferibles.

| Tratamiento | Transferibles | No Transferibles | Total |
|-------------------|---------------|------------------|-------|
| Sin rbST | 36 | 1 | 37 |
| Con rbST | 48 | 0 | 48 |
| Total | 84 | 1 | 85 |
| Chi-cuadrado 1,31 | | | |

“El número de folículos creciendo se incrementó cuando vacas o vaquillas fueron tratadas con rbST y la administración de rbST en adición a gonadotropinas incrementó el número de embriones transferibles colectados después de la superovulación” (Lee, 2007, p.198). “La utilización de rbST antes del inicio de la superovulación no aumento el número de estructuras totales colectadas, pero aumento el porcentaje de embriones viables, independientemente de la dosis utilizada 250 mg o 500 mg” (Neves, 2005, p.208)

Sin embargo, la variabilidad entre experimentos puede estar relacionada a muchos factores incluyendo la dosis de rbST, el método de examinación ovárica, tipo y dosis de gonadotropina y tanto el número como la condición corporal de animales usados en tales estudios. (Velásquez et al., 2009, p.166)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La comparación mediante ultrasonografía del número de cuerpos lúteos, permitió observar y contabilizar las cantidades producidas en cada uno de los tratamientos. Esta herramienta es de mucha utilidad en los protocolos de superovulación pues permite tener una idea del número de embriones o estructuras totales que podrían obtenerse al momento del lavado.

El uso de la somatotropina recombinante bovina incrementó la cantidad de embriones del estadio de mórula ($p < 0,10$), diferencia muy importante en nuestro medio debido al limitado desarrollo y aplicación de la técnica.

No se encontró un efecto significativo ($p > 0,05$) al comparar el grado de calidad de las estructuras totales recolectadas. Sin embargo, al analizar el grado de calidad para la etapa de mórula, se encontró diferencia significativa ($p > 0,10$) entre tratamientos, siendo el mejor el tratamiento con rbST.

5.2. Recomendación

Bajo las condiciones del experimento, se recomienda la utilización de rbST por provocar el mayor número de cuerpos lúteos y número de estructuras/vaca, un mayor número de mórulas, un mayor incremento de mórulas especialmente de grado 1 y mayor número de embriones transferibles.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, J. (2013). *Efecto de la Somatotropina Recombinante Bovina (rbST) sobre la concepción en vacas Jersey sincronizadas con dispositivos de Progesterona (CIDR) + Estradiol e inseminadas a tiempo fijo*. (Tesis de Maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Barrera, J., Fernández, E., Mixan, E., Rengifo, O. y Melisho, E. (2013). Efecto de somatotropina (rbST) sobre la respuesta superovulatoria en bovinos. *Spermova*, 3(1), 81-82.
- Bó, G. y Mapletoft, R. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, 10 (3), 344-348.
- Caravaca, F., Castel, J., Guzmán, J., Delgado, M., Mena, Y., Alcalde, M. y González, P. (2005). *Bases de la producción animal*. Sevilla, España: RC IMPRESORES SCA.
- Carballo, D. (2012). *Superovulación en la primera onda folicular*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- FAO (1991). *Training manual for embryo transfer in cattle*. Recuperado el 14 de octubre de 2015, de <http://www.fao.org/3/a-t0117e/index.html> .
- García, A. (Octubre de 2002). La Somatotropina Bovina, su efecto sobre el crecimiento, la producción de leche y la reproducción. Conferencia llevada a cabo en el XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal, Trujillo, Venezuela.
- Garzón, N., Urrego, R. y Giraldo, C. (2007). Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *Revista CES/ Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2), 68-77.

- González, J. (2013). *Respuesta superestimuladora de vaquillas Holstein tratadas con dos dosis de somatotropina*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Estado de México.
- González-Maldonado, J., Rangel-Santos, R. y Rodríguez-de Lara, R. (2015). Superovulatory response and embryo quality of Holstein heifers treated with one or two injections of somatotropina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 28, 339-346.
- Gutiérrez, D. y Báez, G. (2014). La ultrasonografía en bovinos. *Respuestas*, 19(1), 99-106.
- Guzella, T. (2014). *Efecto de una dosis reducida de somatotropina recombinante bovina asociada a protocolos de superovulación en la fertilidad de embriones transferidos para receptoras en lactación*. (Tesis de Maestría). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Sao Paulo.
- Hafez, E. y Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (7ma. Ed.). México, D.F., México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hasler, J., Bilby, C., Collier, R., Denham, S. & Lucy, M. (2003). Effect of recombinant bovine somatotropin on supervulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*. 59, 1919-1928
- Hernández, J. y Gutiérrez, C. (2013). La somatotropina bovina recombinante y la reproducción en bovinos, ovinos y caprinos. *Agrociencia*, 47, 35-45.
- Hincapié, J. y Pipaon, E. (2003). *Técnicas para mejorar la eficiencia reproductiva en animales de granja*. Tegucigalpa, Zamorano, Honduras.
- Hincapié, J., Campo, E. y Blanco, G. (2005). *Trastornos reproductivos en la hembra bovina*. (2da. Ed.). Tegucigalpa, Honduras, Litocom Editores.
- INAHMI. (2014). *Anuario Meteorológico N°51-2011*. Recuperado de <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/wp-content/uploads/anuarios/meteorologicos/Am%202011.pdf>

- Jiménez, C. (2009). Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56, 195-214.
- Lee, H., Hwang, S. y Yoon, J. (2007). Effects of Bovine Somatotropin (bST) administration combined with Controlled Internal Drug Release (CIDR) on embryo quality and pregnancy of Hanwoo (Korean Native Beef Cattle) during commercial embryo transfer program. *Asian-Australasian Journal Animal Science*. 20 (2), 194-199.
- Márquez, C. (2011). *Somatotropina bovina recombinante y viabilidad de embriones bovinos divididos*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- Márquez, C., Rangel, R., Rodríguez, R., Gutiérrez, C. y García, C. (Septiembre 2010). Recombinant bovine somatotropine (rbST) in superovulated Charolais cows. En S. Merton (Presidencia), *26th Scientific Meeting*. Conferencia llevada a cabo en el 26th Annual Meeting A.E.T.E. Kuopio, Finlandia.
- Mogollón, E., Arcila, V., Serrano, C. y Cardona, R. (2006). Comparación cuantitativa y cualitativa de los embriones obtenidos con dos diferentes productos comerciales con base en FSH en vacas y novillas Holstein. *Revista Spei Domus*. 3 (4), 10-12.
- Moraes, F. (2008). *Efeito da somatotropina recombinante bovina (rbST) na resposta ovulatoria e na qualidade dos embriões de vacas da raça nelore*. (Tesis de Maestría). Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
- Moreira, F., Badinga, L., Burnley, C. y Thatcher, W. (2002). Bovine somatotropin increase embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*. 57, 1371-1387.
- Neves, E., Ramos, A. y Marques Junior, A. (2005). Pré-tratamento com somatotropina bovina (rbST) na superovulação de doadoras da raça Holandesa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57 (2), 205-209.

- Palma, G. (2001). *Biotecnología de la Reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Ribeiro, E., Bruno, R., Farias, A., Hernández, J., Gómes, G., Surjus, R. Santos, J. (2014). Low Doses of Bovine Somatotropin Enhance Conceptus Development and Fertility in Lactating Dairy Cows. *Biology of Reproduction*. 90(1), 1-12.
- Salinas, D. (2013). *Efecto de la aplicación de Gonadotropina coriónica equina (eCG) en vacas donantes superovuladas con Folltropin ®-V (FSH-p liofilizada)*. (Tesis de Maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Santos, J., Juchem, S., Cerri, R., Galvão, K., Chebel, R., Thatcher, W., Bilby, C. (2004). Effect of bsT and reproductive management on reproductive performance of Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 87, 868-881.
- Sartori, R., Baruselli, P., Souza, A., Cunha, A. y Wiltbank, M. (2008). Recent advances in ovulation synchronization and superovulation in dairy cattle. *Animal Reproduction*, 6 (1), 194.
- Szabari, M. (2008). *Effects of embryo transfer on breeding of Holstein Friesian* (Thesis of Doctoral –Ph.D.- Dissertation). University of Kaposvár, Kaposvár, Hungary.
- Velásquez, M., Zaraza, J., Oropeza, A., Webb, R. y Niemann, H. (2009). The role of IGF1 in the *in vivo* production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction*, 137, 161-180.
- Vélez, M.; Hincapié, J.; Matamoros, I. & Santillán, R. (2002). *Producción de Ganado Lechero en el Trópico*. (4ta. Ed.). Zamorano, Honduras: Zamorano Academic Press.
- Villena, E. y Jiménez, J. (2006). *Manual Práctico de Ganadería*. Madrid, España. Cultural S.A.
- Yanza, F. (2013). *Efecto de la Somatotropina Recombinante Bovina sobre la concepción en vacas Holstein sincronizadas con Ovsynch (GNRH + Prostaglandina) e inseminadas a tiempo fijo*. (Tesis de Maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de variancia del número de cuerpos lúteos y estructuras recolectadas/vaca en la comparación de tratamientos con y sin rbST.

| Fuentes de Variación | de G.L | Cuerpos Lúteos | Número de estructuras / vaca |
|----------------------|--------|----------------|------------------------------|
| Total | 9 | | |
| Tratamiento | 1 | 14,40 ns | 12,10 ns |
| Error | 8 | 7,90 | 5,30 |
| Promedio (nro.) | | 10,20 | 8,50 |
| CV (%) | | 27,56% | 27,08 |

Anexo 2. Análisis de variancia del número de estructuras según su etapa de desarrollo en la comparación de tratamientos con y sin rbST.

| Fuentes de Variación | de G.L | Mórulas | Blastocistos | Blastocisto Expandido |
|----------------------|--------|---------|--------------|-----------------------|
| Total | 9 | | | |
| Tratamiento | 1 | 28,90* | 0,00 ns | 0,00 ns |
| Error | 8 | 6,00 | 0,00 | 0,00 |
| Promedio (nro.) | | 7,90 | 0,50 | 0,10 |
| CV (%) | | 31,01% | 0,00 | 0,00 |

* Significancia $p < 0,10$, ns = no significativo $p > 0,10$

Anexo 3. Análisis de variancia del número de estructuras según su grado de calidad en la comparación de tratamientos con y sin rbST

| Fuentes de Variación | de G.L | Grado 1 | Grado 2 | Grado 3 | Grado 4 |
|----------------------|--------|----------|---------|---------|---------|
| Total | 9 | | | | |
| Tratamiento | 1 | 14,40 ns | 0,40 ns | 0,40 ns | 0,00 ns |
| Error | 8 | 8,15 | 1,20 | 1,75 | 0,00 |
| Promedio (nro.) | | 6,80 | 1,00 | 0,60 | 0,10 |
| CV (%) | | 41,98 | 109,54 | 220,48 | 0,00 |

Anexo 4. Análisis de variancia del número de mórulas con base en su grado de calidad, en la comparación de tratamientos con y sin rbST.

| Fuentes de Variación | de G.L | Grado 1 M | Grado 2 M | Grado 3 M | Grado 4 M |
|----------------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Total | 9 | | | | |
| Tratamiento | 1 | 25,60 * | 0,10 ns | 0,90 ns | 0,00 ns |
| Error | 8 | 7,35 | 1,35 | 1,70 | 0,00 |
| Promedio (nro.) | | 6,40 | 0,90 | 0,50 | 0,10 |
| CV (%) | | 42,36% | 129,10% | 260,77% | 0,00 |

* Significancia $p < 0,10$, ns = no significativo $p > 0,10$

Anexo 5. Análisis de variancia del número de embriones transferibles y no transferibles en la comparación de tratamientos con y sin rbST

| Fuentes de Variación | de G.L | Embriones transferibles | Embriones no Transferibles |
|----------------------|--------|-------------------------|----------------------------|
| Total | 9 | | |
| Tratamiento | 1 | 14,40 ns | 0,00 ns |
| Error | 8 | 4,50 | 0,00 |
| Promedio (nro.) | | 8,40 | 0,10 |
| CV (%) | | 25,25% | 0,00 |

ns = no significativo $p > 0,10$

Anexo 6. Resumen Estadístico de las variables representativas

La tabulación de los datos registrados para el número de cuerpos lúteos y total de estructuras post tratamiento se obtuvo los siguientes resultados:

| Variable | Sin rbST | | | Con rbST | | |
|-------------------|----------|----------|-------|----------|----------|-------|
| | Media | DesvStan | Total | Media | DesvStan | Total |
| Cuerpos Lúteos | 9,00 | 3,61 | 45 | 11,40 | 1,67 | 57 |
| Total Estructuras | 7,40 | 2,70 | 37 | 9,60 | 1,82 | 48 |

Anexo 7. Resumen Estadístico del total de las estructuras

Las estructuras recolectadas fueron clasificadas según su grado de desarrollo de la siguiente manera:

| Variable | Sin rbST | | | Con rbST | | | Total Estructuras |
|-----------------------|----------|----------|-------|----------|----------|-------|-------------------|
| | Media | DesvStan | Total | Media | DesvStan | Total | |
| Mórulas | 6,20 | 2,95 | 31 | 9,60 | 1,82 | 48 | 79 |
| Blastocisto | 1,00 | 1,41 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0 | 5 |
| Blastocisto Expandido | 0,20 | 0,45 | 1 | 0,00 | 0,00 | 0 | 1 |
| Total | | | 37 | | | 48 | 85 |

Anexo 8. Prueba de Chi-cuadrado para el Grado de Desarrollo Embrionario

| Tratamiento | Mórula | Blastocisto | Blastocisto Expandido | Total | X ² calculado | X ² tabular |
|-------------|--------|-------------|-----------------------|-------|--------------------------|------------------------|
| Sin rbST | 31 | 5 | 1 | 37 | | |
| Con rbST | 48 | 0 | 0 | 48 | 8,37* | 5,99 |
| Total | 79 | 5 | 1 | 85 | | |

Del análisis de tablas de contingencia para el grado de desarrollo embrionario se puede apreciar que no existe relación ($p < 0,05$) entre los tratamientos, el uso de somatotropina recombinante bovina (rbST) produjo mayor cantidad de mórulas a diferencia de lo ocurrido sin el uso de rbST en el que se obtuvieron blastocistos y blastocistos expandidos. El gráfico muestra los resultados con respecto al desarrollo embrionario.

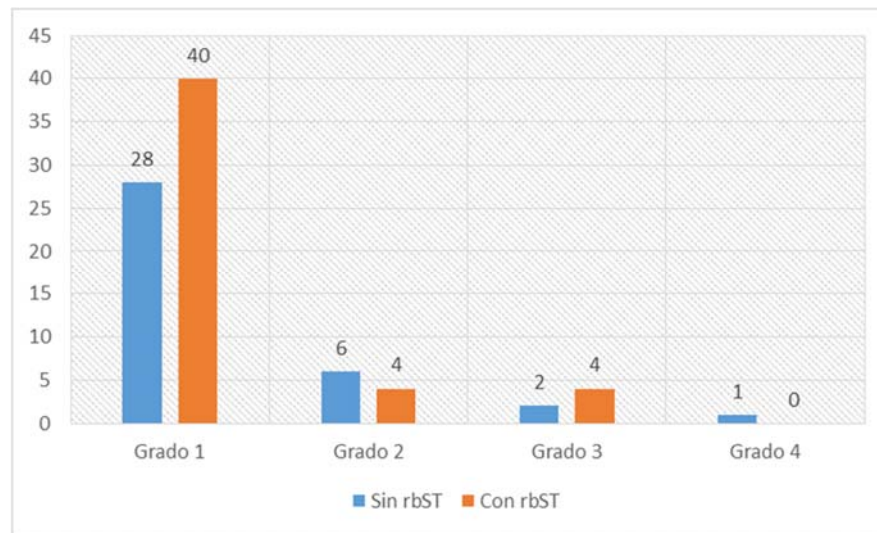


Número de estructuras según Grado de Desarrollo Embrionario

Anexo 9. Prueba de Chi-cuadrado para la Calidad de estructuras

| Tratamiento | Grado 1 | Grado 2 | Grado 3 | Grado 4 | Total | X ² calculado | X ² tabular |
|-------------|---------|---------|---------|---------|-------|--------------------------|------------------------|
| Sin rbST | 28 | 6 | 2 | 1 | 37 | | |
| Con rbST | 40 | 4 | 4 | 0 | 48 | 2,81 | 7,81 |
| Total | 68 | 10 | 6 | 1 | 85 | | |

Se realizó un análisis de tablas de contingencia para la calidad de estructuras colectadas y se encontró la misma relación ($p > 0,05$) para los tratamientos con rbST y sin la aplicación de rbST. Es decir que existe una proporcionalidad de la calidad de estructuras como se puede apreciar en el gráfico:

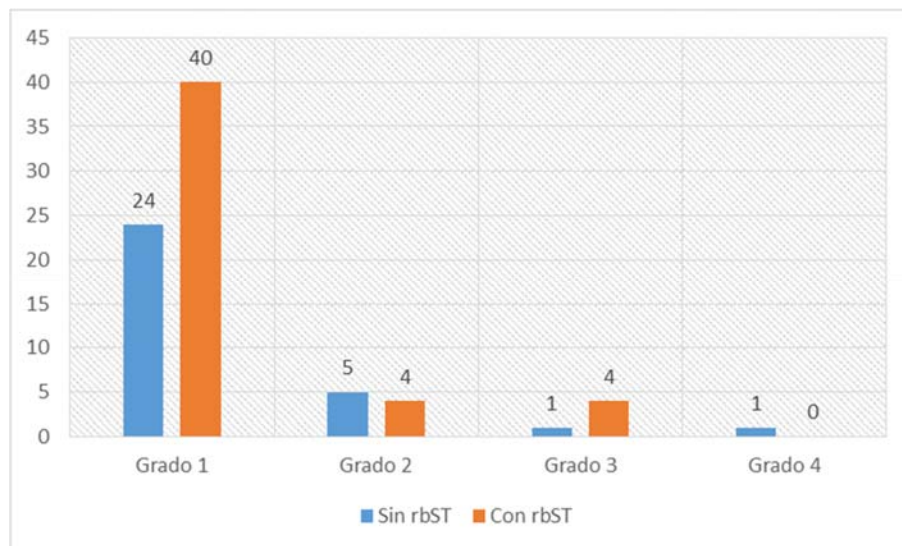


Número de estructuras según la calidad de desarrollo embrionario

Anexo 10. Prueba de Chi-cuadrado para el Grado de Morulación

| Tratamiento | Grado 1 | Grado 2 | Grado 3 | Grado 4 | Total | X ² calculado | X ² tabular |
|-------------|---------|---------|---------|---------|-------|--------------------------|------------------------|
| Sin rbST | 24 | 5 | 1 | 1 | 31 | | |
| Con rbST | 40 | 4 | 4 | 0 | 48 | 3,41 | 7,81 |
| Total | 64 | 9 | 5 | 1 | 79 | | |

Se realizó tabla de contingencia para analizar el grado de morulación de las estructuras colectadas, es decir la calidad de las mórulas. Se encontró relación entre los tratamientos ($p > 0,05$) que respondieron proporcionalmente en la producción de mórulas. En el gráfico se aprecia la distribución de calidad de embriones en el desarrollo embrionario de mórula.

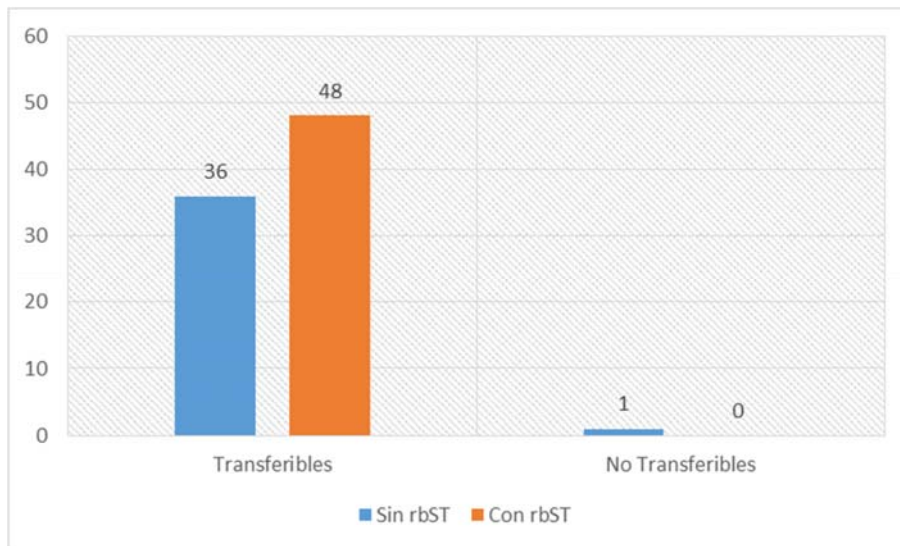


Grado de morulación por tratamiento

Anexo 11. Prueba de Chi-cuadrado para las estructuras transferibles y no transferibles

| Tratamiento | Transferibles | No Transferibles | Total | X ² calculado | X ² tabular |
|-------------|---------------|------------------|-------|--------------------------|------------------------|
| Sin rbST | 36 | 1 | 37 | | |
| Con rbST | 48 | 0 | 48 | 1,31 | 3,84 |
| Total | 84 | 1 | 85 | | |

En la presente investigación se encontró relación entre los tratamientos ($p > 0,05$) en la producción de estructuras y tan solo se obtuvo 1 estructuras no viable o no transferible. El gráfico muestra el número de estructuras según su viabilidad.



Viabilidad de estructuras colectadas

Anexo 12. ANOVA de cuerpos lúteos

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Cuerpos Luteos | 10 | 0,19 | 0,08 | 27,56 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|-------|----|-------|------|---------|
| Modelo. | 14,40 | 1 | 14,40 | 1,82 | 0,2139 |
| Tratamiento | 14,40 | 1 | 14,40 | 1,82 | 0,2139 |
| Error | 63,20 | 8 | 7,90 | | |
| Total | 77,60 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,09924

Error: 7,9000 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Sin 9,00 5 1,26 A

Con 11,40 5 1,26 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 13. ANOVA de Total de Estructuras

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|-------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Estructuras | 10 | 0,22 | 0,12 | 27,08 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|-------|----|-------|------|---------|
| Modelo. | 12,10 | 1 | 12,10 | 2,28 | 0,1692 |
| Tratamiento | 12,10 | 1 | 12,10 | 2,28 | 0,1692 |
| Error | 42,40 | 8 | 5,30 | | |
| Total | 54,50 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,35759

Error: 5,3000 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Sin rbST 7,40 5 1,03 A

Con rbST 9,60 5 1,03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 14. ANOVA para Desarrollo Embrionario (Mórulas)

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| Morulas | 10 | 0,38 | 0,30 | 31,01 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|-------|----|-------|------|---------|
| Modelo. | 28,90 | 1 | 28,90 | 4,82 | 0,0595 |
| Tratamiento | 28,90 | 1 | 28,90 | 4,82 | 0,0595 |
| Error | 48,00 | 8 | 6,00 | | |
| Total | 76,90 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,57245

Error: 6,0000 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Sin 6,20 5 1,10 A

Con 9,60 5 1,10 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 15. ANOVA de Grado 1 de Calidad de Total de Estructuras

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Total Grado1 | 10 | 0,18 | 0,08 | 41,98 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|-------|----|-------|------|---------|
| Modelo. | 14,40 | 1 | 14,40 | 1,77 | 0,2204 |
| Tratamiento | 14,40 | 1 | 14,40 | 1,77 | 0,2204 |
| Error | 65,20 | 8 | 8,15 | | |
| Total | 79,60 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,16360

Error: 8,1500 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Sin 5,60 5 1,28 A

Con 8,00 5 1,28 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 16. ANOVA de Grado 2 de Calidad de Total de Estructuras

Análisis de la varianza

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| Total Grado2 | 10 | 0,04 | 0,00 | 109,54 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo. | 0,40 | 1 | 0,40 | 0,33 | 0,5796 |
| Tratamiento | 0,40 | 1 | 0,40 | 0,33 | 0,5796 |
| Error | 9,60 | 8 | 1,20 | | |
| Total | 10,00 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,59765

Error: 1,2000 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Con 0,80 5 0,49 A

Sin 1,20 5 0,49 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 17. ANOVA de Grado 3 de Calidad de Total de Estructuras

Análisis de la varianza

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| Total Grado3 | 10 | 0,03 | 0,00 | 220,48 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo. | 0,40 | 1 | 0,40 | 0,23 | 0,6454 |
| Tratamiento | 0,40 | 1 | 0,40 | 0,23 | 0,6454 |
| Error | 14,00 | 8 | 1,75 | | |
| Total | 14,40 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,92934

Error: 1,7500 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Sin 0,40 5 0,59 A

Con 0,80 5 0,59 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 18. ANOVA de Grado 1 de Calidad de Mórula

Análisis de la varianza

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| Morula Grado 1 | 10 | 0,30 | 0,22 | 42,36 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo. | 25,60 | 1 | 25,60 | 3,48 | 0,0990 |
| Tratamiento | 25,60 | 1 | 25,60 | 3,48 | 0,0990 |
| Error | 58,80 | 8 | 7,35 | | |
| Total | 84,40 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,95397

Error: 7,3500 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Sin 4,80 5 1,21 A

Con 8,00 5 1,21 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 19. ANOVA de Grado 2 de Calidad de Mórula

Análisis de la varianza

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| Morula Grado2 | 10 | 0,01 | 0,00 | 129,10 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo. | 0,10 | 1 | 0,10 | 0,07 | 0,7924 |
| Tratamiento | 0,10 | 1 | 0,10 | 0,07 | 0,7924 |
| Error | 10,80 | 8 | 1,35 | | |
| Total | 10,90 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,69456

Error: 1,3500 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Con 0,80 5 0,52 A

Sin 1,00 5 0,52 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 20. ANOVA de Grado 3 de Calidad de Mórula

Análisis de la varianza

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| Morula Grado3 | 10 | 0,06 | 0,00 | 260,77 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo. | 0,90 | 1 | 0,90 | 0,53 | 0,4876 |
| Tratamiento | 0,90 | 1 | 0,90 | 0,53 | 0,4876 |
| Error | 13,60 | 8 | 1,70 | | |
| Total | 14,50 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,90158

Error: 1,7000 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Sin 0,20 5 0,58 A

Con 0,80 5 0,58 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 21. ANOVA de Embriones Transferibles

Análisis de la varianza

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| Transferibles | 10 | 0,29 | 0,20 | 25,25 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo. | 14,40 | 1 | 14,40 | 3,20 | 0,1114 |
| Tratamiento | 14,40 | 1 | 14,40 | 3,20 | 0,1114 |
| Error | 36,00 | 8 | 4,50 | | |
| Total | 50,40 | 9 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,09383

Error: 4,5000 gl: 8

Tratamiento Medias n E.E.

Sin 7,20 5 0,95 A

Con 9,60 5 0,95 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 22. Fotografías



Conservación lavado



Varios materiales



Materiales para colecta y transferencia



Solución para lavado



Cajas con materiales y Baño María



Limpieza de genitales



Aplicación de anestésico



Lavado de embriones



Colecta de embriones (Medio Holding)



Esteroscopios



Búsqueda y clasificación de embriones

Embriones colectados

