



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



“SUPEROVULACIONES CONTINUAS EN VACAS DONADORAS
BROWN SWISS PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES
TRANSFERIBLES”

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. ANGEL ESCOBEDO ARIZACA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2020



DEDICATORIA

- Todos estos años de dedicación y esfuerzo, acompañados de las eventualidades que ocurrieron, los dedico sobre todo a quien ha sido mi aliado y mi benefactor, a Dios que, sin Él, nada hubiera sido posible, por la culminación de mi carrera por haberme dado la Vida, Sabiduría y Oportunidad de haber logrado llegar a ser un profesional.
- A mis padres por su mutuo apoyo incondicional Ricardo Escobedo Pacsi y Dominga Arizaca Choque, que me motivaron a cumplir un paso importante en mi vida.
- A mi compañera de mi vida Guadalupe y mi gran tesoro Camila Aylin, por su constante apoyo y colaboración de siempre durante la ejecución del presente trabajo.
- A mis queridos hermanos Julio, Rosa, Mila y Nancy por su constante apoyo y colaboración de siempre durante mi formación profesional.
- Al Dr. Teodosio Huanca Mamani (+), por su apoyo y consejos siendo el director del INIA ILLPA PUNO.

ANGEL.



AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional del Altiplano-Puno por ser alma mater de mi formación profesional.
- A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a los docentes que me brindaron sus conocimientos y sus sabias enseñanzas durante mi formación profesional.
- Al EEA ILLPA INIA PUNO por haberme facilitado sus instalaciones y ganado para la realización de la presente tesis.
- A mi gran amigo y maestro, mi más sincero agradecimiento, con admiración y respeto al Dr. Guido Pérez Durand, asesor del presente trabajo de investigación, quien desinteresadamente me brindo su orientación, apoyo y demás consejos.
- Al Mg.Sc. MVZ Uri Harold Pérez Guerra, por su acertada colaboración durante la redacción del presente trabajo de investigación.
- A los docentes Ph D. Bernardo Roque Huanca, MVZ. Gerardo Godofredo Mamani Choque y M.Sc. José Iván Quiñones García, por su colaboración y comprensión desinteresada como miembros del jurado.
- A mis amigos Ing. Percy Llerena Delgado, MVZ Julio Cesar Ttito Ccama por el aliento y motivación durante el transcurso de la ejecución de la presente tesis.
- A mis grandes amigos y mentores Ing. Oscar Rengifo Garrido y MV David Bazan, en el apoyo de la ejecución de la presente tesis.



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN..... 9

ABSTRACT.....10

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN..... 12

1.1.1. Objetivo General 12

1.1.2. Objetivos Específicos..... 12

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. SUPEROVULACIÓN 13

a. Hormonas que producen Superovulación 13

b. Dinámica folicular durante la superovulación. 15

c. La ovulación en la superovulación. 16

d. El celo en las vacas superovuladas..... 17

2.2 VARIABILIDAD DE TRATAMIENTOS HORMONALES 18

a. Gonadotropina empleada 18

b. Estado del ovario al momento del tratamiento 18

c. Estado nutricional 19

d. Raza 19

2.3 RECOLECCIÓN DE EMBRIONES 20

2.4 OBTENCIÓN Y BÚSQUEDA DE EMBRIONES..... 21

2.5 GRADOS DE CALIDAD DE OVOCITOS 22

a. Grado I: Excelente 22

b. Grado II: Bueno 22

c. Grado III: Regular..... 22

d. Grado IV: Malo..... 22

2.6 ANTECEDENTES..... 23



CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO	24
3.2. ANIMALES DE ESTUDIO	24
3.3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	25
3.3 ANALISIS ESTADISTICO	29

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSION

V. CONCLUSIONES.....	41
VI. RECOMENDACIONES.....	42
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS.....	50
8.1 Anexo Estadístico	50
8.2 Anexo fotográfico	54

Área: Reproducción animal

Tema: Superovulación en vacas Brown Swiss

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 27 de noviembre de 2020



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de vacas donadoras según colecta sucesiva	24
Tabla 2. Protocolo de superovulación de donantes de embriones	26
Tabla 3. Proporción de vacas en relación al número de colectas realizadas.....	31
Tabla 4. Proporción de donadoras que respondieron a las colectas sucesivas con estructuras ovocitos/embriones.....	32
Tabla 5. Número promedio de cuerpos lúteos por vaca, según número de colecta sucesiva	33
Tabla 6. Número promedio de estructuras recuperadas por donante en relación a las colectas sucesivas.	34
Tabla 7. Promedio de estructuras transferibles por donante en relación al número de colectas sucesivas.	35



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Barras de los promedios de estructuras transferibles según lavados sucesivos en relación a una regresión lineal.....	37
Figura 2. Proporción de estructuras transferibles según número de colectas	38
Figura 3. Proporción de estadios embrionarios recuperados en relación al número	39
Figura 4. Variación individual de producción de estructuras transferibles en cada una de las donadoras.....	40



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

CIP	: Centro de Investigación y Producción
eCG	: Gonadotropina coriónica equina
CL	: Cuerpo lúteo
GnRH	: Hormona liberadora de las gonadotropinas
FSH	: Hormona folículo estimulante
LH	: Hormona luteinizante
ng	: Nanogramos
ml	: Mililitros
PGF2α	: Prostaglandina F 2 alfa
PRL	: Prolactina
hCG	: Gonadotropina coriónica humana
PMSG	: Suero gonadotrópico de la yegua preñada
hMG	: Gonadotropina menopáusica humana
ARNr	: Ácido ribonucleico ribosomal
h	: Horas
UI	: Unidades internacionales
INIA	: Instituto de innovación e investigación agraria
Kg	: Kilogramo
TM	: Toneladas métricas
HMG	: Hormones menopausic gonadotropin



RESUMEN

El estudio se realizó en la Estación Experimenta Agraria Illpa, del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), distrito de Paucarcolla, provincia de Puno de la región Puno a una altitud de 3810 metros con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos de superovulaciones continuas en vacas donadoras Brown Swiss sobre el número de estructuras recuperadas. Se utilizaron 33 vacas Brown Swiss a las cuales se sometieron superovulaciones continuas. Los resultados fueron que el 97.65% de vacas respondieron a superovulaciones sucesivas sin existir diferencia significativa entre el número de colectas ($p>0.05$), asimismo en el 84.34% de vacas se obtuvieron estructuras ovocitos/embriones sin diferencia ($p>0.05$); el número promedio de cuerpos lúteos fue de 9.73 por vaca sin diferencia entre las vacas ($p>0.05$); el promedio general de estructuras ovocitos/embriones recuperadas por vaca fue de 7.43, el número de colecta no tuvo influencia significativa sobre el promedio de estructuras recuperadas ($p>0.05$); el promedio general de estructuras transferibles por vaca fue 5.47 ($p>0.05$) sin embargo, el número de colecta no tuvo influencia significativa sobre el promedio de estructuras transferibles; el coeficiente de determinación fue de 2.19% indica que el efecto del número de colecta sobre el promedio de estructuras transferibles es bajo, que por cada lavado sucesivo el promedio de estructuras transferibles disminuyó en 0.06 ($p<0.05$). El porcentaje promedio de estructuras transferibles fue 61.79% que al análisis estadístico estos porcentajes son similares entre número de colectas ($p<0.05$). El porcentaje de blastocistos transferibles fue de 2.21% y el de mórulas transferibles fue del 97.79%, esta proporción fue diferente en las sucesivas colectas. En conclusión, se demostró que la colección de embriones de lavados sucesivos es factible realizar bajo condiciones del altiplano.

Palabras clave: Bovino, blastocisto, embriones, ovocitos.



ABSTRACT

The study was carried out at the Ilpa Agrarian Experiment Station, of the National Institute of Agrarian Innovation (INIA), district of Paucarcolla, Puno province of the Puno region at an altitude of 3810 meters, with the aim of evaluating the effect of the treatments of Successive superovulations in Brown Swiss donor cows on the number of structures recovered. 33 Brown Swiss cows were used which were subjected to repeated superovulation. The results were that 97.65% of cows responded to successive superovulations with no significant difference between the number of collections ($p>0.05$), also in 84.34% of cows, oocyte/embryo structures were obtained without difference ($p>0.05$); the average number of corpora lutea was 9.73 per cow with no difference between the cows. The general average of oocyte/embryo structures recovered per cow was 7.43, the collection number had no significant influence on the average of recovered structures ($p>0.05$). The general average of transferable structures per cow was 5.47 ($p>0.05$), however, the collection number had no significant influence on the average of transferable structures; The coefficient of determination was 2.19%, indicating that the effect of the collection number on the average of transferable structures is low, that for each successive washing the average of transferable structures decreased by 0.06 ($p<0.05$). The average percentage of transferable structures was 61.79%. According to statistical analysis, these percentages are similar between the number of collections. The percentage of transferable blastocysts was 2.21% and that of transferable morulae was 97.79%, this proportion was different in the successive collections. In conclusion, it was shown that the collection of embryos from successive flushes is feasible under highland conditions.

Keywords: Bovine, blastociste, embryos, ovocytes.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se observa que la ganadería en vacunos en el departamento de Puno en estos últimos 20 años viene mejorado gradualmente a través de la inseminación artificial, la ganadería de vacunos con buen fenotipo con alta producción de leche que sobrepasa los 12 litros al pastoreo, dicho adelanto se viene mostrando en las diferentes ferias ganaderas que se tiene en el departamento (Juliaca, Ayaviri, Santa Rosa, entre otros) alcanzando una producción de 55 575.5 TM (toneladas métricas) para el 2016 con un aumento del 56 849.4 TM para el 2017 con precios de S/. 1.57 por litro de leche y S/. 11.5 por Kg de queso. El interés del criador de vacunos en la actualidad es contar con animales genéticamente superiores mediante proyectos productivos cuyo objetivo es mejorar el hato de las asociaciones de ganaderos, comunidades campesinas, entre otros. La aplicación de biotecnologías reproductivas como la transferencia de embriones permite producir animales de alto genético (DRA, 2010 y 2014).

La transferencia de embriones, es una técnica para el mejoramiento genético del ganado, consiste en provocar que una vaca o vaquilla "donadora", mediante un tratamiento hormonal e inseminación con un toro probado con alto valor genético, produzca varios embriones que siete días después son extraídos para ser transferidos a otras hembras "receptoras", que previamente fueron sincronizadas con el celo de la "donadora". La receptora no transmite ninguna característica genética a la cría y sólo sirve para mantenerla hasta el parto y durante la lactancia, se emplea esta tecnología porque en condiciones normales, cada vaca produce una sola cría al año, lo cual significa que en su vida reproductiva producirá de 6 a 8 crías, mientras que con la transferencia de embriones



se han llegado a tener más de cien crías de una vaca durante su vida productiva, lo cual facilita el mejoramiento genético, con el consecuente incremento de la producción de carne y/o leche (Palma *et al.*, 1995; Titi *et al.*, 2015).

En trabajos de superestimulación ovárica en el CIP Chuquibambilla utilizando eCG en vacunos criollos se logró una tasa de ovulación de 68.8 a 78.1 % asimismo se logró embriones transferibles del 16.7 al 30% (Pérez, 2008), en vacunos Brown Swiss utilizando FSH en dosis decreciente en tres vacas, se logró recuperar 35 embriones siendo transferibles 42.86% (García, 2008) en estudio actuales reportan tasa de recuperación de 66.7 y 87.5% (Titi *et al.*, 2015). Las experiencias sobre la técnica de transferencia de embriones en la región Puno es restringida; sin embargo, con el Proyecto INCAGRO luego de superovular 5 vacas colectaron 23 estructuras ováricas, identificándose 10 embriones de calidad excelente, se transfirió a receptoras de la misma especie, lográndose 02 crías (Gamarra *et al.*, 2008). Por lo tanto, es una necesidad sentida en la Región Puno confirmar la viabilidad de la superestimulación continua para la obtención de embriones para fines de transferencia de embriones.

1.1 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto de superovulaciones continuas en vacas donadoras Brown Swiss sobre el número de los embriones recuperados.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de superovulaciones continuas en vacas donadoras Brown Swiss sobre el estadio de desarrollo de los embriones recuperados.
- Evaluar la variación individual de las donadoras sobre la producción de embriones transferibles.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. SUPEROVULACIÓN

La estimulación funcional del ovario bovino tiene el objetivo de conseguir ovulaciones múltiples (superovulación) ha sido objeto de numerosos estudios durante los pasados 50 años. Esta técnica ha evolucionado considerablemente desde 1927, año en que Smith y Engle consiguieron incrementar las tasas de ovulación mediante el implante de tejidos obtenidos de la adenohipófisis de ratas y ratones (Ginther *et al.*, 1989). En el momento actual se emplean tres tipos diferentes de gonadotropinas para inducir la superovulación en el ganado vacuno: la hormona folículo estimulante (FSH), la gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG) o gonadotropina coriónica equina (eCG) y la gonadotropina menopáusica humana (hMG). Dado que esta última tiene una gran similitud con la PMSG y su utilización es muy restringida teniendo una doble función de gonadotropinas como son de FSH y LH (Driancourt, 1991; Roche y Boland, 1991).

a. Hormonas que producen Superovulación

Gonadotropina sérica de yegua gestante (eCG o PMSG).

Esta sustancia fue descubierta por Cole y Hart en 1930 al comprobar que la administración de suero de yegua gestante a un grupo de ratas estimulaba el crecimiento folicular e incrementaba la tasa de ovulación, estableciendo así la base del tratamiento superovulatorio. Esta hormona es una glucoproteína presente en grandes cantidades en el suero de yegua gestante entre los días 46 y 130 de gestación y presenta en una misma molécula actividades biológicas propias de la FSH y de la



LH (Papkoff, 1978; González *et al.*, 1990). La larga vida media de la PMSG, permite inducir la superovulación con una única administración. La dosis utilizada para conseguir una buena respuesta superovularía oscila en un rango de 800 a 3000 UI (Greve *et al.*, 1983). Además, se ha comprobado que cuando se supera la dosis de 3000 UI se provoca una marcada reducción del número de folículos capaces de ovular, así como una gran variabilidad en el número de embriones transferibles obtenidos (Saumande and Chupin, 1986; Zeitoun *et al.*, 1991). En la raza Rubia Gallega, se han obtenido resultados similares a los descritos en otras razas administrando una dosis comprendida entre las 2000 y las 3000 UI (Fernández, 1992).

Hormona folículo estimulante (FSH)

Al igual que la PMSG, es una hormona glucoproteica cuyo peso molecular es de 37.300 Daltons sintetizado a nivel de la adenohipófisis o hipófisis anterior (Grimek *et al.*, 1979; Squires, 2010). Está compuesta por dos subunidades, una subunidad α que es estructuralmente similar a la de la LH y una subunidad β responsable de su actividad biológica específica. Además, tiene un componente característico de carbohidratos constituido por azúcares neutros, hexosaminas y un bajo contenido en ácido siálico. Este último aspecto se refleja en una vida media muy corta, aproximadamente de 110 minutos (Moor *et al.*, 1984), lo que obliga a realizar aplicaciones repetidas para conseguir una buena estimulación de la actividad ovárica (Grimek *et al.*, 1979). Dentro de los productos existentes en el mercado con actividad FSH, el más comúnmente utilizado es la FSH-p (homogeneizado de pituitaria). El régimen de administración más usual es de dos inyecciones diarias durante 4 o 5 días, administrando dosis decrecientes hasta alcanzar una dosis total de 28 a 50 mg Armour (Mapletoft *et al.*, 1991).



b. Dinámica folicular durante la superovulación.

La administración de gonadotropinas exógenas provoca un marcado incremento del número total de folículos que crecen con respecto a la situación observada en un ciclo estral normal. El número de folículos de gran tamaño se incrementa a los cuatro días de iniciar el tratamiento, y a los dos días de la descarga preovulatoria de LH se observa una abrupta disminución del número de folículos, coincidiendo con el momento de la ovulación (Kaneko *et al.*, 1992).

El número de folículos presentes en el ovario se incrementa a lo largo del tratamiento, siendo los de pequeño tamaño (4-5 mm) ya presentes en el ovario al comenzar el tratamiento, son los más numerosos en los dos primeros días disminuyendo a partir de ese momento. Los de tamaño medio (5-9 mm) sufren un incremento muy marcado entre los días uno y tres, mientras que los de gran tamaño (mayores de 10 mm) lo hacen desde el día 2 al 5 tras el inicio del tratamiento (Purwantara *et al.*, 1993). Driancourt *et al.* (1991) observaron que en las vacas con una buena respuesta a la estimulación con PMSG se producía un claro reclutamiento secuencial de los folículos, desde la clase de folículos pequeños (tres días después de administrar la PMSG) a las clases de medianos o grandes (cinco días después de administrar la PMSG). Por el contrario, en las vacas con mala respuesta al tratamiento, no se observó un incremento apreciable del número de folículos pequeños en el tercer día y, aunque aumenta el número de folículos de tamaño mediano en el quinto día, no se incrementaba el número de folículos grandes.



c. La ovulación en la superovulación.

Hyttel et al. (1991), han descrito las modificaciones observadas en el proceso de maduración nuclear de los ovocitos al aplicar un tratamiento hormonal para estimular la función ovárica. Los resultados obtenidos por estos autores indican que únicamente el 63% de los ovocitos sigue un proceso normal de maduración nuclear. La mayor parte del 37% restante sufre una reiniciación prematura de la meiosis, alcanzando el estado de Diacinesis o incluso el de Metafase I antes de la descarga preovulatoria de LH. Por último, un pequeño grupo de ovocitos no llega a completar la maduración nuclear, quedándose detenida en el estado de Diacinesis o en el de Metafase I. El prematuro reinicio de la meiosis había sido observado previamente por Callesen et al. (1987), quienes lo atribuyeron a la actividad LH de los productos hormonales utilizados. Esta situación es más frecuente cuando se utiliza la PMSG, debido a que, además, altera los niveles séricos de algunas hormonas endógenas (progesterona, estradiol y LH). Así, se ha comprobado que los tratamientos superovulatorios que reducen el porcentaje de folículos atrésicos no mejoran el número de embriones transferibles obtenidos (Blondin and Sirard, 1994).

El envejecimiento de los ovocitos provoca una disminución en el porcentaje de fertilización (Evans and Armstrong, 1984), un aumento en la incidencia de polispermia (Odor and Blandau, 1956; Benevides-Filho *et al.*, 1990), cambios en algunos orgánulos (Bedford, 1971) y una disminución en la concentración de ARNr (Bogomolova *et al.*, 1981). Por ello, se puede comprobar que la tercera parte de los cigotos producidos tras la superovulación presentan anomalías citogenéticas detectables (King *et al.*, 1986). Assey et al. (1994) demostraron que las alteraciones inducidas en los ovocitos por el tratamiento superovulatorio se producen muy pronto,



antes del pico de LH. Entre las alteraciones observadas se citan las siguientes: formación prematura del espacio perivitelino, ausencia de migración mitocondrial, reducción en el número de gotas lipídicas, aumento en la cantidad de vesículas, alargamiento del compartimento de Golgi y aparición de mitocondrias pleomórficas.

d. El celo en las vacas superovuladas

En los animales superovulados el celo se produce generalmente a las 48 h de administrar el agente luteolítico, frente a las 72 h en que aparece en los animales no tratados (Jensen *et al.*, 1982; Barnes *et al.*, 1982). Además, en estos animales, la disminución de la concentración de progesterona como respuesta a la administración prostaglandina es más rápida y también lo es la elevación de los niveles de estradiol, lo que contribuye a que la descarga preovulatoria de LH y la aparición de síntomas de celo se produzcan con una mayor rapidez que en los animales no tratados (Roberge *et al.*, 1995). Además, la duración del periodo de celo es menor, debido a que el pico de LH es más uniforme y esto está asociado con la aparición del celo. En las vacas no tratadas la descarga preovulatoria de LH tiene lugar entre las 12 y las 24 h posteriores al inicio del celo, mientras en las hembras tratadas se produce en las 6 primeras h que siguen al inicio del celo. Las menores concentraciones de progesterona y las mayores de estradiol presentes en los animales superovulados contribuyen al acortamiento de la duración del celo y de la descarga de LH (Barnes *et al.*, 1982).



2.2 VARIABILIDAD DE TRATAMIENTOS HORMONALES

a. Gonadotropina empleada

La FSH-p es la gonadotropina más empleada en la superovulación de hembras bovinas que tienen como función principal el desarrollo de los folículos debido a que estos poseen receptores específicos a nivel de las células de la granulosa (Squires, 2010). El tratamiento con esta hormona se basa en la administración de dos dosis diarias durante 4 ó 5 días, comenzando en general los días 9 y 13 del ciclo estral. En menor medida se han utilizado extractos de pituitaria equina u ovina y una gonadotropina aislada de la orina de mujeres menopaúsicas (HMG) (Rivera *et al.*, 1991).

Obteniendo ovocitos y embriones recolectados en promedio de 9 ± 7 con la aplicación de 50 mg de FSH, con la aplicación de 40 mg de FSH reportan 9 ± 2 estructuras entre ovocitos y embriones observando una gran variabilidad a la respuesta multiovulatoria con FSH (Kim *et al.*, 1988; Gonzáles *et al.*, 1990)

b. Estado del ovario al momento del tratamiento

Se considera aspectos que provienen de la utilización de la ultrasonografía, los folículos primordiales formados durante la vida intrauterina comienzan paulatinamente durante la vida reproductiva; estos continúan su desarrollo a preantrales (primarios o secundarios) y antrales, siguiendo luego la atresia en la mayoría de los folículos o la ovulación. La formación del antro folicular es independiente del nivel de gonadotropinas, sin embargo, el número de folículos que alcanzan tal desarrollo si depende del nivel de estas, la administración de gonadotropina tiene por objeto incrementar el número de folículos preantrales que se



convierten en antrales y reducir a su vez el número de folículos antrales que sufren atresia (Grasso *et al.* 1989). La producción de embriones por donadora según el día del ciclo estral son para el día 3 fue 2.7 ± 1.3 ; día 6 fue 4.3 ± 2.1 ; día 9 fue 7.2 ± 1.4 y día 12 de 3.9 ± 2 .

c. Estado nutricional

El nivel de energía de la ración puede influir tanto en las tasas de ovulación y de fecundación como en la viabilidad de los embriones, en la mayoría de los estudios realizados se ha considerado la importancia de la nutrición en animales inducidos a tener ovulaciones dobles para que gesten mellizos. El efecto del estrés nutricional sobre la viabilidad embrionaria, en los estadios pre implantados ha sido estudiado muy extensamente en el ovino con resultados contradictorios. En vacas lecheras, se ha comprobado que las dietas ricas en proteínas producen un exceso de nitrógeno no proteico (amoníaco y urea) que afecta la fertilidad; cuando se las indujo a superovular, la suplementación con urea en el periodo comprendido entre la inseminación y recolección de embriones afectó el número de embriones recolectados y la calidad de los mismos, no ocurrió lo mismo cuando la suplementación comenzó 10 días antes. En síntesis, la urea es tóxica para los embriones, pero las vacas son capaces de ajustar su concentración plasmática por un periodo de 10 días (Dawuda *et al.*, 2002).

d. Raza

En un estudio retrospectivo sobre 1596 tratamientos de superovulación efectuado en donantes de 13 razas distintas productoras de carne, encontraron que la raza donante es un factor de variación en aspectos tales como:



- Numero de ovocitos y embriones recolectados
- Numero de embriones transferibles
- Porcentaje de embriones transferibles
- Numero de preñeces/recolección
- Porcentaje de preñez

Cabe resaltar que el inbreeding afecta los resultados de los tratamientos de superovulación. Esto quedó demostrado en un estudio llevado a cabo en Brasil en animales *Bos taurus* de una raza lechera nativa denominada Mantiqueira, donde se comprobó que cuando el coeficiente de inbreeding supera el 9% la calidad de embriones disminuye (Herrera Alvarez *et al.*, 2005).

2.3 RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Los embriones bovinos, destinados a un programa de Transferencia de Embriones (TE) son obtenidos del útero por medios no quirúrgicos. Su recolección y transferencia con éxito depende de varios factores. En primer lugar, de la viabilidad de éstos para sobrevivir y llegar a término después de ser recolectados del tracto genital, evaluados morfológicamente y transferidos al útero una hembra receptora, con cambios de medio y temperatura (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993).

El ***Método no quirúrgico de recolección***; la posibilidad de colocar en la especie bovina la sonda a través del cérvix abrió nuevas posibilidades a la recolección de embriones, simplificando el procedimiento y disminuyendo el trauma uterino. Par ello se crearon diferentes modelos de catéteres: rígidos, semirrígidos y flexibles; los mismos podían tener dos vías: una para insuflar el balón de goma e inmovilizar el catéter y la segunda para inyectar y recolectar el medio. Los catéteres de tres vías permiten inyectar el medio por la segunda vía mientras la tercera conduce el líquido fuera del útero. En la



actualidad se emplean catéteres rígidos y flexibles, de 2 y 3 vías y tres métodos de recolección:

- Circuito cerrado con flujo continuo
- Circuito cerrado con flujo discontinuo
- Circuito abierto con flujo discontinuo (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993).

2.4 OBTENCIÓN Y BÚSQUEDA DE EMBRIONES

Posterior al lavado la aislación de embriones de los grandes volúmenes de medio se puede hacer por medio de sedimentación o filtración del medio recuperado. Para la sedimentación de los embriones se emplean recipientes con forma de embudo y un cierre hermético en su fondo probetas o frascos de 0.5 a 1 litro. Los recipientes deben estar a una temperatura constante, recomendada 20°C (baño de agua o preferentemente temperatura de ambiente) y protegidos de la luz directa. La temperatura no parece ser crítica para los embriones solo deberá tenerse especial precaución de evitar los cambios bruscos de calor (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993; Palma, 2008).

Actualmente se emplean filtros estériles con malla de acero inoxidable o plástico de 60 a 90 micras de diámetro de poro, esto es más pequeño que el diámetro del embrión (150 micras). Estos se pueden presentar en recipientes en forma de embudo donde se vuelca el medio recolectado del frasco (después del lavaje) o directamente del catéter (durante el lavaje) (Cabrera y Fernández, 2006; Palma, 1998).



2.5 GRADOS DE CALIDAD DE OVOCITOS

La determinación del grado de calidad del embrión permite caracterizar, en términos más o menos cuantitativos, las posibilidades de desarrollo y posterior nacimiento de un ternero a partir del embrión obtenido. Los diferentes grados de calidad son determinados por medio de la observación microscópica de la morfología con ayuda de una lupa estereoscópica. Existen distintas escalas de calidad embrionaria, desarrolladas por distintos equipos de trabajo. Tanto la observación, como la diferenciación entre un grado y otro es subjetiva y depende, en gran parte, de la experiencia del operador (Gorlach, 1999; Palma, 2003). Clasificándose de la siguiente forma:

a. Grado I: Excelente

El desarrollo corresponde al día de la recolección. No existe defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniformes, simétricos, de forma esferoidea y la zona pelúcida está intacta.

b. Grado II: Bueno

El embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares. Su forma puede ser ligeramente irregular.

c. Grado III: Regular

El embrión posee varios defectos detritus celulares, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida.

d. Grado IV: Malo

El embrión posee muchos defectos los correspondientes al Grado III más desarrollo retardado, seria ruptura de la zona pelúcida el embrión puede



encontrarse parcialmente fuera de ella forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o fragmentación de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y la clara degeneración. Esta categoría es considerada como no transferible (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993).

2.6 ANTECEDENTES

La superovulación se realizó en condiciones de altura (CIP Chuquibambilla) en vacunos criollos utilizando un protocolo T1 1500 UI de eCG, T2 1500 UI de eCG más 100 ug de GnRH, T3 1500 UI de eCG más 3,000 UI de HCG y T4 grupo control encontró cuerpos lúteos de 4 a 6, 3 a 6, 3 a 6 y 1 para los T1, T2, T3 y T4 respectivamente, para el número de embriones normales fue de 16.7 (2/12), 30.0 (3/10), 18.2 (2/11) Y 100 (2/2) para T1, T2, T3 y T4 respectivamente (Pérez, 2008). En otro estudio llevado en el distrito de Mañazo con vacas Brown Swiss utilizando FSH en tres donadoras logro recuperar 35 embriones siendo de calidad excelente 14.29% y de calidad buena 14.29% (García, 2008), en ambos casos no se determinó el porcentaje de fertilidad por no ser su objetivo. Otro estudio realizado en vacas Brown Swiss con tratamiento multiovulatorio de 400 y 200 mg adicionando LH o GnRH como hormona para la ovulación reportan una tasa de ovulación entre 66.7 y 87.5%, tasa de recuperación y calidad de embriones similares en los tratamientos indicando la ausencia de ovulación en dos de los tratamientos, reportando una tasa de recuperación de embriones entre 5 y 7 por vaca (Titi, 2014). La superovulación realizada en condiciones de altura en razas Angus, Charolaise y Brown Swiss reporta una tasa de recuperación de 69.23%, un total de 13 cuerpos lúteos de los cuales se obtuvo 5 embriones viables y 4 no viables (Jaimes, 2016).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El estudio se realizó en la Estación Experimental Agraria Illpa, del Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA, geográficamente en el distrito de Paucarcolla, provincia de Puno de la región Puno a una altitud de 3810 msnm.

3.2. ANIMALES DE ESTUDIO

La unidad experimental estuvo constituida por vacas Brown Swiss seleccionadas como aparentemente normales evaluadas previamente por un examen ginecológico completo, con un parto al menos y fueron distribuidos de la siguiente manera:

Tabla 1. Distribución de vacas donadoras según colecta sucesiva

Número de colectas	Número de vacas
1	33
2	21
3	16
4	10
5	5
Total, general	85



3.3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

a. Producción de embriones

Para el primer objetivo se utilizó el proceso metodológico de la transferencia de embriones que se emplea en una primera colecta y los pasos sucesivos son como se describe a continuación:

- ***Sincronización de onda folicular***

Consistió en eliminar algún folículo dominante (FD) que pudiese existir en las donadoras aplicando el dispositivo con Progesterona (CIDR®: 1g de progesterona) y estrógenos (Estrovet®) 1 ml que fueron aplicados al inicio del protocolo de superovulación considerado como día “0” (ver cuadro 2), el CIDR fue extraído el día 7 por la tarde al momento de aplicar eCG; esta combinación permitió regresionar al FD e iniciar una nueva onda folicular con un reclutamiento de folículos todos sensibles a la acción de la FSH y eCG (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993).

- ***Superovulación***

La superovulación consistió en la estimulación hormonal de las donantes para la formación y desarrollo de varios folículos y su ovulación en ambos ovarios en un momento previamente fijado. La superovulación se indujo mediante la aplicación de una serie continuada de dosis decreciente y dos veces al día de FSH (días 4, 5 y 6 de la aplicación de CIDR y Estrógenos) y eCG se aplicó el día 7 dividida en 2 dosis una en la mañana y otra en la tarde cada una con dosis de 200 UI, tal como se muestra en el Cuadro 2 (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993).



- ***Luteolisis y ovulación***

La luteolisis es el proceso de destrucción del Cuerpo Lúteo (CL) para evitar la secreción de Progesterona de la donadora este fue realizada mediante la aplicación de 5 mL de Lutalyse® (Clorprostenol) el día 6 por la tarde junto con la última dosis de FSH; mientras que la ovulación fue estimulada mediante la aplicación de 2.5 ml de Ovalyse® (acetato de busarelina) el día 8 de iniciado el protocolo de superovulación (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993. Ver Tabla 2).

Tabla 2. Protocolo de superovulación de donantes de embriones

Día Protocolo	DONADORA	
	Mañana (6 am.)	Tarde (6 pm.)
día -2		
día -1		
día 0	Colocar CIDR + 1 ml BE (estrovet)	
día 4	4 ml. FSH (Folltropin)	4 ml. FSH (Folltropin)
día 5	3 ml. FSH (Folltropin)	3 ml. FSH (Folltropin)
día 6	2ml FSH	2ml FSH + 5ml Lutalyse
día 7	200 UI eCG (Folligon)	200 UI eCG (Folligon) + retirar CIDR
día 8	GnRH 2.5 ml Ovalyse	12h después. IA
día 9	24h después. IA	
día 10		
día 11		
día 15	COLECCIÓN DE EMBRIONES	



Inseminación de las hembras donantes

Las donantes mostraron celo aproximadamente entre las 36 a 48 h tras la aplicación de la prostaglandina $F_{2\alpha}$, la inseminación artificial (IA) se realizó de 8 a 10 h de iniciado el celo (día 8 por la tarde y 9 por la mañana respectivamente. Ver cuadro 01), la IA fue realizada en todas las donantes con semen de dos toros importados (Italia) en pajillas de 0.25 ml con una concentración de 25×10^6 por dosis, descongeladas a 37°C por 30 a 45 segundos en todos los casos aplicando el semen a nivel del cuerpo del útero (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993).

b. Evaluación del número de embriones

Colección de embriones

La colección de embriones se realizó 7 días posteriores de la inseminación artificial mediante un lavado uterino transcervical o colecta no quirúrgica a través de la vagina, guiada por vía transrectal. Los pasos a seguir se describen detalladamente:

- El animal previamente limpiada toda la zona perineal y su anestesia epidural con lidocaína al 2% en una cantidad de 4.5 a 6 ml. por animal dependiendo del peso y tamaño, la colecta duro en promedio entre 15 a 20 min por animal.
- Para el lavado se utilizó un catéter o sonda flexible con balón inflable (Meustadt/Aisch®) este se introdujo con un mandril o estilete que le da rigidez, a través del cérvix hasta uno de los cuernos; cuando el extremo de la sonda se halló en la curvatura mayor del cuerno uterino se retirará el mandril o estilete de 8 a 10 cm y se sigue avanzando con cuidado la sonda flexible en dirección craneal.



- Seguidamente se insufló el balón con 10 a 20 ml. de aire, la situación del catéter es correcta cuando el balón, según los diferentes tamaños de los distintos úteros, se encuentra más o menos 5 cm craneal a la bifurcación uterina; la colecta se llevó a cabo con medio EmFlush atemperada (25°C aproximadamente, colocando entre 250 ml) en fracciones de 30 a 50 ml que fluyen al filtro EmCon.
- Mientras el líquido de lavado fluyo es conveniente mover y masajear ligeramente el cuerno uterino para que aquellos embriones localizados en criptas sean llevados hacia el exterior, teniendo el mismo proceso para el otro cuerno.
- Finalmente se aplicó Lutalyse (prostaglandina F2 α) al terminar el lavado para que la donante reinicie su actividad ovárica normal además de evitar una posible gestación múltiple en caso de que no se hubieran arrastrado todos los embriones tras el lavado (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993).

Búsqueda y aislamiento de los embriones

- Los recipientes con la solución EmFlush fueron trasladados al laboratorio y se mantuvieron a temperaturas entre 25 y 35°C hasta la búsqueda y evaluación de los mismos se sedimentaron por 15 a 20 min.
- El contenido del filtro se vació sobre una placa de Petri cuadrículadas identificada con el numero de la donante y cuerno uterino, para la búsqueda de los embriones se realizó con un estereoscopio a 20X.
- Los embriones encontrados se aspiraron con una Unopette® o pipeta adaptada a una jeringa de tuberculina para posteriormente fue llevado a una placa de Petri pequeña con medio de mantenimiento donde se agruparon todos (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993).



c. Calidad de embriones

Evaluación de los embriones

Bajo la lupa del microscopio estereoscópica a un objetivo de 10 y 30X, se examinó el estado morfológico de los embriones y se clasificaron según su calidad según las recomendaciones de IETS (2003). Los embriones en perfecto estado desde el punto de vista morfológico se pasaron a una placa de Petri pequeña con medio de mantenimiento y recién fueron lavados 10 veces (para diluir posibles gérmenes), conservados a temperatura de ambiente hasta su transferencia en receptoras (Cabrera y Fernández, 2006; Palma and Brem, 1993).

3.3 ANALISIS ESTADISTICO

Las variables fueron el número de estructuras recuperadas, estadio de desarrollo de las estructuras recuperadas y variación individual de las donantes; todos los análisis estadísticos fueron evaluados mediante el programa estadístico SAS® (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA) versión 9.2.

Para analizar la asociación entre el estadio de desarrollo de las estructuras recuperadas con el efecto periodo se analizó mediante una tabla de contingencia *de Chi-cuadrada* cuya fórmula es la siguiente:

$$x_c^2 = \sum_{i=1}^f \sum_{j=1}^c \frac{(o_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$$

Donde:

o_{ij} = Es el total observado por la i-ésima fila, j-ésima columna

e_{ij} = Es el total esperado por la i-ésima fila, j-ésima columna

f = Es el número de filas

c = Es el número de columnas.



Para analizar el efecto de los tratamientos multiovulatorios continuos en donantes sobre la producción de embriones transferibles se utilizó el modelo de *regresión lineal* cuya fórmula la siguiente:

$$y = a + bx$$

Donde:

y= Es la variable dependiente (Es el total de embriones transferibles colectados (Grado 1, 2 y 3 según IETS)).

a= Es el intercepto de la regresión lineal

b= Es el coeficiente de regresión o pendiente de la regresión

x= Es la variable independiente.

Para evaluar la variación individual de la donante de embriones sobre el número de estructuras recuperadas se analizó mediante un *diseño completamente al azar* siendo la donante el factor aleatorio y factor fijo se considerará al periodo de recuperación para la comparación de medias significantes se utilizó la *Prueba de Tukey* cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$y_{ij} = u + t_i + e_{ij}$$

Donde:

y_{ijk} = Es la variable respuesta (número de estructuras recuperadas y estructuras transferibles)

u = Es la media general o constante común

t_i = Es el efecto aleatorio del número de colecta

e_{ijk} = Es el error experimental.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

El **Tabla 3** muestra la proporción de donadoras que tuvieron respuesta a diferente número de colectas sucesivas, observando tanto en la primera como quinta colecta más del 90% de donadoras que mostraron respuesta positiva al protocolo de superovulación a las que fueron sometidas las donadoras.

Tabla 3. Proporción de vacas en relación al número de colectas realizadas.

Número de colectas	Porcentaje de respuesta
1	32/33 (96.97%)
2	21/21 (100%)
3	16/16 (100%)
4	9/10 (90%)
5	5/5 (100%)
TOTAL	83/85 (97.65%)

(p=0.4594)

El porcentaje final de vacas que respondieron al tratamiento de superovulación fue de 97.65% o dicho de otra forma respondieron 83 superovulaciones las donadoras de 85 superovulaciones realizadas comparando entre colectas tampoco muestra diferencias estadísticas ($p>0.05$) por tanto podríamos indicar que no existe dependencia entre el número de colectas sucesivas de donadoras y la respuesta al protocolo de superovulación.

Los altos porcentajes en los lavados sucesivos se debe que existió una adecuada respuesta de las hembras al estímulo de la superovulación inducida por la hormona folículo estimulante (FSH) por tal motivo en la actualidad la mayoría de los tratamientos son efectuados con FSH además se puede indicar la adición de la hormona eCG en dosis menores 200 UI y solo en dos oportunidades al final del protocolo de superovulación el cual aseguro la ovulación que se demuestra en la respuesta positiva de la donadoras (Gong *et al.*,1991; Rigoglio *et al.*,2013). La evaluación del estado reproductiva de las donantes, así como el manejo en general son requisitos imprescindibles para plantear un esquema de superovulación eficiente a nivel de altura en general (Angel *et al.*,2011); bajo las condiciones del presente trabajo de investigación estos aspectos fueron los más adecuados el cual se demuestra en los porcentajes altos de respuesta de donadoras a colecciones sucesivas.

La **Tabla 4** muestra específicamente la proporción de aquellas donadoras que respondieron al protocolo de superovulación en colectas sucesivas en relación a las estructuras colectadas (ovocitos/embriones), a pesar de disminuir el número de donadoras con el transcurrir las colectas sucesivas fueron superiores a 75%.

Tabla 4. Proporción de donadoras que respondieron a las colectas sucesivas con estructuras ovocitos/embriones.

Número de colectas	Porcentaje de respuesta
1	29/32 (90.63%)
2	18/21 (85.71%)
3	12/16 (75%)
4	7/9 (77.78%)
5	4/5 (80%)
TOTAL	70/83 (84.34%)

(p=0.6611)

El porcentaje de vacas de las que se obtuvieron ovocitos/embriones es de 84.34% (Tabla 4), al análisis estadístico indica que no hay diferencia estadística entre el número de colecciones ($p>0.05$); por tanto, no se ha observado disminución de estructuras recuperadas tras los lavados sucesivos (5 colectas) resultados similares son reportados por diversos autores (Hasler, 2000) quienes obtuvieron 5.5 embriones promedio en vacas superovuladas hasta en 13,8 oportunidades dichos resultados se deben a las adecuadas condiciones de desarrollo de la técnica, respuesta intrínseca del animal y condiciones favorables durante todo el proceso de producción de embriones *in vivo*.

La **Tabla 5** muestra el número promedio de cuerpos lúteos (CLs) en las donantes con colectas sucesivas a las que fueron sometidas las donadoras observando bastante variabilidad en esta característica.

Tabla 5. Número promedio de cuerpos lúteos por vaca, según número de colecta sucesiva

Número de colecta	n	Media \pm DS	Coefficiente de variabilidad
1	32	10.13 \pm 6.60	65.18
2	21	10.81 \pm 5.96	55.17
3	16	9.19 \pm 4.51	49.03
4	9	8.00 \pm 5.24	65.55
5	5	7.60 \pm 3.91	51.47
Total	83	9.73 \pm 5.76	59.2

(p=0.6687)

El número promedio de cuerpos lúteos observado fue de 9.73 por vaca, el coeficiente de variabilidad correspondió al 59.2% porcentaje que indica que el número de CLs es bastante variable, misma variabilidad que se observó a lo largo de las colectas siendo no diferentes a la comparación estadística ($p>0.05$). Estos resultados contrastados

con reportes son similares a un estudio (Lindsell *et al.*, 1986) reportando 16 y 12 CLs en hembras multiovuladas entre los 9 y 12 días del ciclo estral respectivamente, periodo similar al trabajo realizado en esta investigación, esta respuesta aceptable se debe a que en estos días empieza la segunda onda folicular con bastante número de folículos en reclutamiento que responden a estas hormonas como FSH y LH (Cavodevilla y Torquati, 2008), los autores demostraron que los folículos de la primera onda de desarrollo folicular respondieron a los tratamientos de superovulación de la misma manera que lo hicieron en la segunda onda en ambos casos; se obtuvieron mejores resultados cuando el tratamiento comenzó el día antes o el mismo día del inicio de la onda en el presente estudio se realizó el mismo día de inicio como recomiendan (Adams *et al.*, 1994).

La **Tabla 6** muestra el número promedio de estructuras recuperadas tras los lavados sucesivos en las donantes, observando bastante variabilidad en la respuesta analizando se podría interpretar que se lograron de 7 hasta 12 a 13 estructuras (embriones/ovocitos) sin embargo también se puede recuperar tan solo 2 estructuras por donante.

Tabla 6. Número promedio de estructuras recuperadas por donante en relación a las colectas sucesivas.

Número de colecta	n	Media ± DS	Coefficiente de variabilidad
1	29	7.86 ± 6.23	79.35
2	18	7.94 ± 6.99	88
3	12	6.08 ± 3.80	62.48
4	7	7.29 ± 5.15	70.75
5	4	6.50 ± 3.11	47.83
Total	70	7.43 ± 5.77	77.59 (p=0.9697)

El promedio general de estructuras recuperadas por vaca fue de 7.43 ± 5.77 lo que indica que la respuesta entre los animales en estudio es muy variable (Tabla 6) la

comparación de estructuras recuperadas en relación al número de colectas se observó que no existe diferencia estadística ($p>0.05$), se puede indicar que a medida que se realizó los lavados sucesivos en donantes el número de estructuras no se ve afectado. El promedio de estructuras recuperadas es inferior a lo reportado por autores (Hasler *et al.*, 1983) con reportes de hasta 10 estructuras recuperadas en donadoras, diferencias que puede deberse a efectos raciales, así como reportan (Motta *et al.*, 2011) quienes lograron 9,8 estructuras recuperadas para el caso de vacas Gyr, observándose una gran variabilidad a la respuesta de protocolos multiovulatorios. En otro estudio realizado con protocolos similares reportaron hasta 17 entre ovocitos/embriones colectados de los cuales sólo se transfirieron 7.2 resultados similares sin embargo con menos variabilidad (Lindsell *et al.*, 1986).

La **Tabla 7**. Específicamente permite mostrar el número de estructuras transferibles por donante en las colectas sucesivas que se realizaron que al igual que las características ya mencionadas muestran mucha variabilidad.

Tabla 7. Promedio de estructuras transferibles por donante en relación al número de colectas sucesivas.

Número de colecta	n	Media \pm DS	Coefficiente de variabilidad
1	24	5.46 \pm 4.32	79.21
2	15	5.87 \pm 4.24	72.28
3	10	4.10 \pm 2.51	61.33
4	6	6.17 \pm 5.64	91.4
5	3	6.67 \pm 4.16	62.45
Total	58	5.47 \pm 4.10	75.1

($p= 0.7535$)

El promedio general de estructuras transferibles por vaca fue de 5.47, sin embargo, es un resultado con alta variabilidad 75.10% (Tabla 7), lo que indica que la respuesta de



donadoras es muy variable al ser sometidas a protocolos de superovulación de la misma forma al comparar estadísticamente si el número de estructuras transferibles tienen influencia en relación al número sucesivo de lavados se observa que no existe tal relación ($p > 0.05$). Los resultados obtenidos son similares con los reportados por otros autores (Lindsell *et al.*, 1986), quienes reportaron una recuperación de 7.2 estructuras transferibles en hembras superovuladas al día 9 similar a lo realizado en el presente estudio; otros autores también reportan estructuras transferibles muy similares a la presente investigación reportando 5.5; 5.7; 3.7; 5.8 y 4.5 en hembras sometidas a 1, 2, 3, 4 y 5 superovulaciones respectivamente con metodología muy parecida al del presente estudio (Hasler, 2000); la variabilidad podría deberse a regulaciones intrínsecas a nivel individual de cada donadora (Donaldson, 1984).

La **Figura 1**. Muestra un diagrama de barras con el promedio de estructuras transferibles obtenidas en las donadoras en relación al número de colectas realizadas, observándose una disminución paulatina según aumenta el número de colectas, dato que es corroborado por la pendiente que resulta al ser sometido a una regresión lineal siendo esta de **-0.0666** lo que indica que la relación es lo mencionado anteriormente.

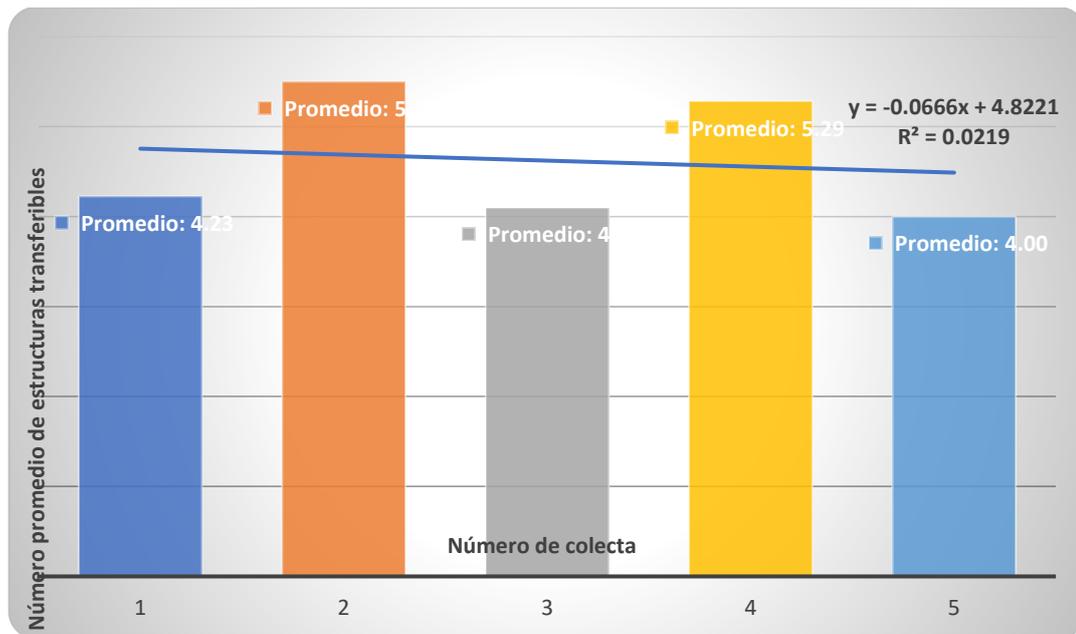


Figura 1. Barras de los promedios de estructuras transferibles según lavados sucesivos en relación a una regresión lineal.

La línea de regresión promedio de estructuras transferibles, según número de colecta, se observó que el coeficiente de determinación fue de **0.0219**, lo cual indica que el modelo sólo explica el 2.19% del efecto del número de colecta con el promedio de estructuras transferibles (ver **Figura 1**); por lo tanto, el número de colectas no es buen predictor de las estructuras transferibles de la misma forma reportes previos de otros investigadores indican que existe una amplia variabilidad en la respuesta individual por cada animal en un esquema de transferencia de embriones con varios números de colectas, observando una disminución a partir del cuarto o quinto lavado sucesivo (Bastidas and Randel, 1987), existiendo reportes que indican lo contrario donde no se observó disminución en el número de estructuras transferibles hasta luego de efectuar diez tratamientos de superovulación (Donaldson and Perry, 1983), lo cual indica que a la fecha los resultados no siguen un patrón constante y la variación individual de los animales en estudio, presentan respuestas disímiles influenciado probablemente por efectos genéticos y ambientales.

Figura 2. Muestra la proporción de estructuras transferibles en relación a las sucesivas colectas en las vacas donadoras observando una mayor proporción de estructuras transferibles.

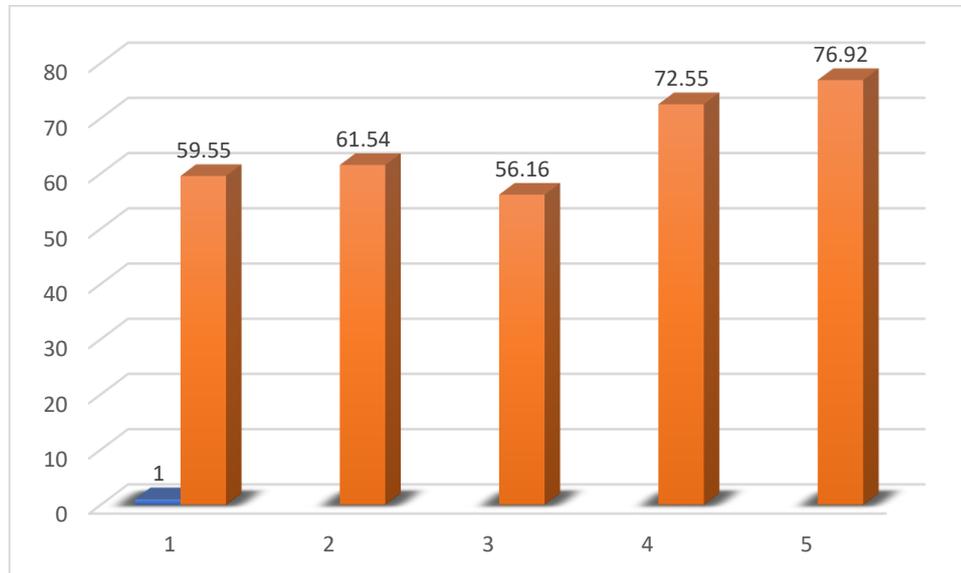


Figura 2. Proporción de estructuras transferibles según número de colectas

La **figura 2** presentada muestra diferencia estadística ($p < 0.05$) al ser sometido a un análisis de varianza teniendo como variable respuesta a las estructuras transferibles y como tratamiento al número de colectas observando mayor proporción de esta última en relación al número de colectas; resultados similares a los reportado por otros autores (Hasler *et al.*, 1983), quienes alcanza el 57.14% de estructuras transferibles y 42.86% de estructuras no transferibles, las ligeras variaciones puede deberse a diferencias inducidas probablemente por niveles productivos o manejo nutricional entre otros factores.

La **Figura 3.** Muestra la proporción de estadios embrionarios recuperados en las colectas sucesivas en las donantes, observando claramente una diferencia al comparar los estadios de Blastocisto y Mórula siendo superior y diferente estadísticamente ($p < 0.05$) la

proporción de Mórulas en colectas de vacas del presente estudio, posterior a ser sometido estas proporciones a una prueba de Chi cuadrado.



Figura 3. Proporción de estadios embrionarios recuperados en relación al número de colectas.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por otros autores (Kaufold *et al.*, 1985) quienes encontraron hasta un 17.27% de blastocistos transferibles y 82,73% de mórulas transferibles en vacas tratadas con eCG al día 8 después del celo, estos resultados son similares a los encontrados en la presente investigación. Las diferencias entre ambas etapas de desarrollo podrían haberse originado por alguna alteración en el tránsito de gametos o a una superovulación tardía, originada probablemente por la hormona administrada en el protocolo de superovulación.

La **Figura 4.** Muestra un diagrama de barras que permite observar la variación individual en cada una de las donadoras en su producción de estructuras transferibles a lo largo del experimento realizado, observando una gran variación entre ellas.

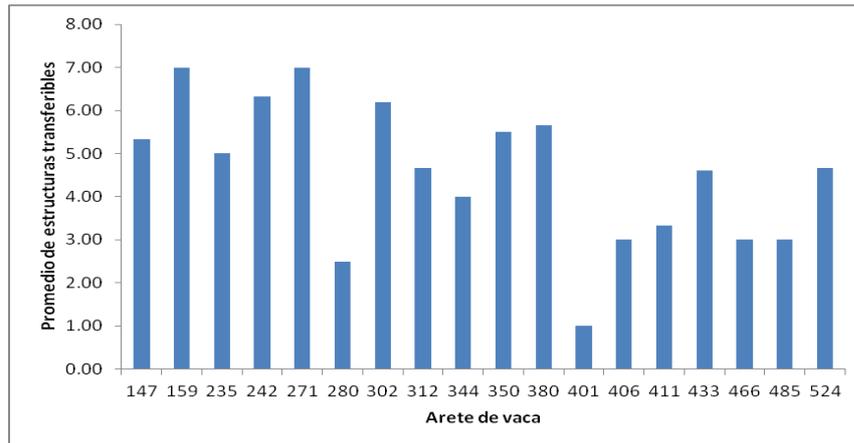


Figura 4. Variación individual de producción de estructuras transferibles en cada una de las donadoras.

En la **Figura 4** el número promedio de estructuras transferibles por vaca correspondió a 4.87 (con fines de análisis estadístico, se ha excluido a aquellas vacas que solamente fueron sometidas a lavado por una sola vez). El coeficiente de variabilidad hallado fue de 74.95%, debido posiblemente a que las diferencias observadas entre vacas, encontrándose animales que en promedio producen una estructura transferible y otras vacas que producen en promedio 7 estructuras transferibles; luego del análisis estadístico se encontró significancia ($p < 0.05$) los datos fueron sometidos a un análisis de varianza donde los tratamientos son el número de colecta y la variable respuesta es la producción de estructuras transferibles; resultados diferentes reportan autores (Donaldson and Perry, 1983), quienes reportan que hasta en diez superovulaciones no alterarían la respuesta superovulatoria.



V. CONCLUSIONES

- El porcentaje de vacas que respondieron al tratamiento de superovulación correspondió al 97.65%, el porcentaje de vacas de las que se obtuvieron estructuras (embriones y ovocitos) fue 84.34%, el número promedio de cuerpos lúteos observado fue de 9.73 por vaca.
- El promedio de estructuras recuperadas por vaca fue de 7.43, el promedio general de estructuras transferibles por vaca fue de 5.47; el porcentaje promedio de estructuras transferibles correspondió al 61.79% de los cuales el porcentaje de blastocistos degenerados correspondió al 1.53%, y para el caso de embriones degenerados este porcentaje ascendió hasta el 45.41%.
- El porcentaje de blastocistos transferibles fue el 2.21% y el de mórulas transferibles ascendió al 97.79%. El número promedio de estructuras transferibles por vaca correspondió a 4.87.



VI. RECOMENDACIONES

- Utilizar el protocolo utilizado en el presente estudio para producir superovulación en vacas donadoras en el Altiplano.
- Utilizar los embriones obtenidos en el presente estudio para realizar la transferencia de embriones a receptoras, para conocer la efectividad de esta técnica reproductiva en los hatos ganaderos del ámbito del departamento de Puno.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams GP, Evans ACO and Rawlings NC. (1994). Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers *Journal of Reproduction and Fertility* 100 27-33
- Ángel, D.C.; M. Piccardi y G. A. Bó (2011). Efecto de los tratamientos superovulatorios continuos en donantes bovinas sobre la producción de embriones transferibles. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC – Córdoba – Argentina.
- Assey, R.J.; Hyttel, P.; Greve, T. y Purwantara, B. (1994). Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 37: 335-344.
- Barnes, M.A.; Castellano, A.M.; Kazmer, G.W.; Wade, R.J. y Halman, R.D. (1982). Effect of exogenous FSH on estrus, ovulation and endogenous hormone release in dairy cows. *Theriogenology* 18: 311-323.
- Bastidas, P. y R. Randel. 1987. Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Theriogenology*. Volume 28, Issue 4, Pages 531–540.
- Blondin, P. y Sirard, M.A. (1994). The influence of oocyte and follicular morphology of developmental competence in superovulated heifers. *Theriogenology* 41 (1): 164.
- Bo, G.A.; Hockley, D.K.; Nasser, L.F. y Mapletoft, R.J. (1994). Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Follitropin-V in beef cattle. *Theriogenology* 42: 963-975.
- Bogomolova, V.I.; Golubitsa, A.N.; Zhelezova, A.I.; Maksimovsky, L.F.; Pashinin, Yu.V.; Poznakhirkina, N.A.; Chugaeva, L.A. y Korochkin, L.I. (1981). A study of embryonic development in two mouse strains during early cleavage. *Ontogenes* 12: 610-616.



- Cabrera, P., & Fernández, A. (2006). Criopreservación de Embriones: una herramienta básica en la Reproducción Asistida. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, 47(2).
- Callesen, H.; Greve, T. y Hyttel, P. (1987). Premature ovulations in superovulated cows. *Theriogenology* 28 (2): 155-156.
- Cole, H.H. y Hart, G.H. (1930). The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Am. J. Physiol.* 93: 57-68.
- Cavodevilla, J. y S. Torquati. 2008. Superovulación en hembras bovinas. In: *Biotecnología de la Reproducción. 2da Edición. Ed. G. Palma. Mar del Plata. Argentina.*
- Dawuda, P. M., Scaramuzzi, R. J., Leese, H. J., Hall, C. J., Peters, A. R., Drew, S. B., & Wathes, D. C. (2002). Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 58(8), 1443-1455.
- Donaldson, L. y B. Perry. 1983. Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. *Theriogenology*. Volume 20, Issue 2, Pages 163–168
- Donaldson, L. 1984. Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology* Volume 21, Issue 6, Pages 1013–1018.
- DRA. 2010. Producción pecuaria de la Región de Puno. OIA.
- Driancourt, M.A. (1991). Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35: 55-79.
- Fernández, M. (1992). Estudio comparativo de técnicas de transferencia embrionaria en hembras bovinas autóctonas de Galicia: Rubia Gallega, Cachena, Caldelana y Vianesa. Tesis Doctoral. Universidad de León. Pp: 597.



- Gamarra, G. (2008). Separatas del curso de transferencia d embriones. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima Perú.
- García, D. (2008). Evaluación de embriones post superovulación en vacas Brown Swiss en el altiplano. Tesis Universidad Nacional del Altiplano. Puno Peru. Pp: 55.
- Ginther, O.J.; Kastelic, J.P. y Knopf, L. (1989). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20: 187-200.
- Gong JG, Bramley T. y R. Webb. (1991). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod*; 45:941-949.
- González, A.; Lussier, J.G.; Carruthers, T.D.; Murphy, B.D. y Mapletoft, R.J. (1990). Superovulation of beef heifers with Folltropin: a new preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology* 35: 519-529.
- Görlach, A. (1999). *Transferencia de embriones en el ganado vacuno* (No. V395. 5 GORt).
- Grasso, F., Guilbault, L. A., Roy, G. L., & Lussier, J. G. (1989). Ultrasonographic determination of ovarian follicular. Development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology*, 31(6), 1209-1220.
- Greve, T.; Callesen, H. y Hyttel, P. (1983). Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord. Vet. Med.* 35: 408-421.
- Grimek, H.J.; Gorski, J. y Wentworth, B.C, (1979). Purification and characterization of bovine follicle-stimulating hormone: comparison with ovine follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 104: 140-147.



- Hasler JF, McCauley AD Schermerhorn EC, and H. Foote.1983. Superovulatory responses in Holstein cows. *Theriogenology*: 19:83-99.
- Hasler J. 1992.Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairycattle. *J. Dairy Sci.* 75, 2857-2879.
- Hasler, J. 2000. In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction* Vol. 15, (Suppl. 5) pp. 47-58
- Álvarez, R. H., da Silva, M. V. G. B., de Carvalho, J. B. P., & Binelli, M. (2005). Effects of inbreeding on ovarian responses and embryo production from superovulated Mantiqueira breed cows. *Theriogenology*, 64(8), 1669-1676.
- Hyttel, P.; Callesen, H.; Greve, T. y Schmidt, M. (1991). Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology* 35 (1): 91-108.
- Jaimes Mamani, S. D. (2016). *Respuesta superovulatorio en vacas brown swiss, aberdeen angus y charolais en altura* (Doctoral dissertation).
- Jensen, A.M.; Greve, T.; Madej, A. y Edqvist, L.E. (1982). Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2a treated cow. *Theriogenology* 18: 33-44.
- Kaneko, H.; Watanabe, G.; Taya, K. y Sasamoto, S. (1992). Changes in peripheral levels of bioactive and immunoreactiveinhibin, estradiol 17-beta, progesterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone associated with follicular development in cows induced to superovulate with equine chorionic gonadotropine. *Biol. Reprod.* 47: 76-82.
- Kim, H. N., Roussel, J. D., Pool, S. H., & Godke, R. A. (1988). The effect of a commercially-available purified FSH and bovine anti-PMSG serum on the superovulation of dairy heifers. *Theriogenology*, 29(1), 267.



- King, W.A; Xu, K.P; Sirard; M.A.; Greve, T.; Leclare, P.; Lambert, R.D y Jacques, P. (1986). Cytogenetic study of parthenogenetically activated bovine oocytes matured in vivo and in vitro. *Gamete Research* 20: 265-274.
- Lindsell, C.E.; Murphy, R.D. y Mapletoft, R.J. (1986). Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-p at different stages of estrous cycle. *Theriogenology* 26 (2): 209-219.
- Mapletoft, R.J.; Bo, G. y Murphy, B.D. (1991).The effect of biological activity of gonadotrophins on superovulation in the cow.Procedings IX Congreso Brasileiro de Reproducao Animal 1: 74-92.
- Moor, R.M.; Kruip, T.A.M. y Green, D. (1984). Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. *Theriogenology* 21: 103-116.
- Motta, P., Ramírez, N., Ramos, N., Valencia, A., Perdomo, W. 2011. Respuesta superovulatoria en número y calidad embrionaria de vacas y novillas Gyr lechero en clima cálido húmedo. *REDVET Rev. Electrón. Vet.* Volumen 12 N° 10.
- Palma, G. A., & Brem, G. (1993). Transferencia de los embriones. *GA Palma & G. Brem Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina*, 143-161.
- Palma GA, Wennigerkind H, Modil J and G Brem (1995) the application of biotechnology in cattle reproduction , the situation today and future applications *Rev Arg Prod Anim*, 159 – 165.
- Papkoff, H. (1978). Relationship of PMSG to the pituitary gonadotrophins. En: *Control of reproduction in the cow*. Ed: J.M. Sreenan. Martin Nijhoff, The Hague. pp: 73-86.



- Pérez, U. (2008). Administración de la eCG como inductor de superovulación y evaluación de embriones en vacas criollas. Universidad Nacional del Altiplano Puno Perú: Pp 63.
- Purwantara, B.; Schmidt, M.; Greve, T. y Callesen, H. (1993). Follicular dynamics prior to and during superovulation in heifers. *Theriogenology* 40: 913-921.
- Rigoglio, N. N., Fátima, L. A., Hanassaka, J. Y., Pinto, G. L., Machado, A. S., Gimenes, L. U., ... & Papa, P. C. (2013). Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology*, 79(4), 673-679.
- Rivera, G. M., Callejas, S. S., Doray, J. M., Schiersmann, G. C., & Alberio, R. H. (1991). Effects of a temporary calf removal and fsh supplementation on postpartum sexual activity in beef cows. In *Congreso Mundial de Veterinária. 24. 1991 08 18-23, 1991 ago 18-23. Rio de Janeiro. BR.*
- Roberge, S.; Rieger, D. y Rawlings, N.C. (1995). Perioovulatory LH, FSH and steroid hormone profiles in superovulated and unstimulated holstein heifers. *Theriogenology* 44 (3): 59-70.
- Roche, J.F. y Boland, M.P. (1991). Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology* 35: 85-90.
- SAS Institute Inc. 2009. *SAS/STAT® 9.2 User's Guide, Second Edition*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Saumande, J. y Chupin, D. (1986). Introduction of superovulation in cyclic heifers: The inhibitory effect of large doses of PMSG. *Theriogenology* 25: 233-237.
- Squires, E. J. (2010). *Applied animal endocrinology*. Cabi.



- Titi Pacosoncco, J., Olivera Marocho, L., & Aguilar Silva, E. (2015). Dosis aplicada de FSH para el crecimiento folicular y tasa de ovulación con LH y GnRH para la recuperación de embriones bovinos, Chuquibambilla-puno. *Ceprosimad*, 3(1), 36-50. Recuperado a partir de <https://journal.ceprosimad.com/index.php/ceprosimad/article/view/52>
- Zeitoun, M.M.; Yassen A.M.; Hassan, A.A.; Fathelbab, A.Z.; Echterkamp, S.E.; Wise, T.H. y Maurer, R.R. (1991). Superovulation and embryo quality in beef cows using PMSG and a monoclonal anti-PMSG. *Theriogenology* 35 (3): 653-667.



ANEXOS

8.1 Anexo Estadístico

Arete de vaca	Número de lavados	Promedio ± desviación estándar	Coefficiente de variación, %	Mínimo	Máximo
147	3	5.33 ± 5.86	109.86	1	12
159	5	7.00 ± 4.18	59.76	2	13
235	3	5.00 ± 3.61	72.11	2	9
242	3	6.33 ± 6.81	107.48	1	14
271	5	7.00 ± 3.74	53.45	2	10
280	2	2.50 ± 2.12	84.85	1	4
302	5	6.20 ± 3.90	62.88	2	12
312	3	4.67 ± 4.04	86.60	1	9
344	2	4.00 ± 1.41	35.36	3	5
350	2	5.50 ± 6.36	115.71	1	10
380	6	5.67 ± 4.37	77.06	1	12
401	4	1.00 ± 0.00	0.00	1	1
406	2	3.00 ± 1.41	47.14	2	4
411	3	3.33 ± 1.53	45.83	2	5
433	5	4.60 ± 3.36	73.08	1	9
466	2	3.00 ± 1.41	47.14	2	4
485	2	3.00 ± 1.41	47.14	2	4
524	3	4.67 ± 2.52	53.93	2	7
Total	60	4.87 ± 3.67	74.95	1	14



Anexo 1. Análisis de varianza para número de cuerpos lúteos, según número de colecta

Sum of

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr> F
Model	4	1.81552069	0.45388017	0.59	0.6687
NUMCOL	4	1.81552069	0.45388017	0.59	0.6687
Error	77	58.92893889	0.76531089		
Corrected Total	81	60.74445957			

R-Square	CoeffVar	Root MSE	CLT Mean
0.029888	27.67682	0.874820	3.160842

Anexo 2. Análisis de varianza para número de embriones transferibles

Sum of

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr> F
Model	4	0.83516763	0.20879191	0.30	0.8738
NUMCOL	4	0.83516763	0.20879191	0.30	0.8738
Error	53	36.36199710	0.68607542		
Corrected Total	57	37.19716473			

R-Square	CoeffVar	Root MSE	TRANSFT Mean
0.022452	34.32166	0.828297	2.413335

Anexo 3. Análisis de varianza para número total de estructuras recuperadas

Sum of

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr> F
--------	----	---------	-------------	---------	-------



Model	4	0.51951448	0.12987862	0.13	0.9697
NUMCOL	4	0.51951448	0.12987862	0.13	0.9697
Error	64	62.50490803	0.97663919		
Corrected Total	68	63.02442251			

R-Square	CoeffVar	Root MSE	TOTALT Mean
0.008243	36.03447	0.988251	2.742514

Anexo 4. Análisis de varianza para variación individual de estructuras transferibles

Sum of

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr> F
Model	17	7.16639584	0.42155270	0.73	0.7535
VACA	17	7.16639584	0.42155270	0.73	0.7535
Error	42	24.19201056	0.57600025		
Corrected Total	59	31.35840641			

R-Square	CoeffVar	Root MSE	TRANSFT Mean
0.228532	32.83046	0.758947	2.311715

Anexo 5. Prueba de chi cuadrado para proporción de estructuras recuperadas

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	4	6.4744	0.1664
Likelihood Ratio Chi-Square	4	6.7632	0.1489
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	1.0528	0.3049
Phi Coefficient		0.1123	



Contingency Coefficient 0.1116

Cramer's V 0.1123

SampleSize = 513

Anexo 6. Prueba de chi cuadrado para proporción de estructuras no transferibles

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	8	37.3564	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Square	8	40.0037	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	6.2159	0.0127
Phi Coefficient		0.4366	
Contingency Coefficient		0.4001	
Cramer's V		0.3087	
SampleSize = 196			

Anexo 7. Prueba de chi cuadrado para proporción de estructuras transferibles

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	4	48.1860	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Square	4	29.7485	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	19.1115	<.0001
Phi Coefficient		0.3899	
Contingency Coefficient		0.3632	
Cramer's V		0.3899	

8.2 Anexo fotográfico

Preparación para iniciar la super ovulación en vacas



Aplicación de hormonas en donadoras y receptoras



Sincronización de celo en donadoras y receptoras



Colección de embriones y preparación de medios de lavado.





Manejo de embriones colectados: Búsqueda, evaluación y congelación.

