



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



FACTORES QUE AFECTAN LA TASA DE PREÑEZ EN VACAS
RECEPTORAS TRANSFERIDAS CON EMBRIONES
PRODUCIDOS *IN VITRO* EN CONDICIONES DE ALTURA

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. TEOFILO BEJAR HUAYLLA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2021



DEDICATORIA

A DIOS, por guiarme en el camino de mi preparación y cumplir con la misión que me encomendó.

*Con todo cariño a mi **padre** alma bendita que descanse en paz **Daniel Ambrocio Bejar Carbajal** que desde el cielo me guio y me protegió mi vida estudiantil.*

*Con mucho cariño a mi **mama Dominga Huaylla Vda de Bejar** por el gran trabajo, esfuerzo e intenso sacrificio y cariño incondicional de apoyarme que hicieron posible este anhelo de ser profesional.*

*A **mis hermanitos** Marco Antonio, Demes Rey, Juan Bautista, Marlene Juana, Rene David, Augusto Marco, Paul Ebred, Nancy Gabriela, Juan Goker, Sonia Nohemi. por el constante gran apoyo moral para seguir adelante y lograr mis objetivos trazados.*

A mis docentes con mucho cariño por compartir con toda la voluntad sus sabidurías, conocimientos que me fortalece en el trayecto de la vida, y de ser profesional.

Con cariño a mi pareja Hayde Fiorela Meza Beltran por su valiosa comprensión y su apoyo moral.

A mis familiares y amistades por su gran amistad que siempre con lleva a una vida llena de alegrías y su apoyo moral.

Teofilo Bejar



AGRADECIMIENTOS

Primero, agradecer con todo mi corazón a Dios por hacer realidad mis sueños

A la Universidad Nacional del Altiplano, por ser el alma mater para mi formación profesional

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme sus aulas y laboratorios para formarme profesional

A los docentes de la FMVZ, por impartirme sus enseñanzas necesarias para mi formación profesional

Al personal que labora en general de la FMVZ, por las facilidades brindadas para la culminación de mi carrera profesional

Al laboratorio de Reproducción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme brindado las facilidades para el desarrollo de mi tesis

AL Dr. Manuel Guido Pérez Durand, mi eterno agradecimiento, respeto y admiración por los conocimientos impartidos y su acertada dirección, desde el inicio de mi proyecto hasta la culminación de la presente tesis.

Al Dr. Uri Harold Perez Guerra, por haberme orientado en la estadística y redacción del presente trabajo de investigación y la paciencia mostrada.

A mis jurados de tesis Dr. Roberto Gallegos, Dra. Nubia Catacora y Dr. Ivan Quiñones por la orientación en la presente tesis.

Teofilo Bejar



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE GRAFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 11

ABSTRACT..... 12

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVO GENERAL 14

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES..... 15

2.2 MARCO TEÓRICO 16

2.2.1 Obtención de ovocitos..... 16

2.2.2 Clasificación de los ovocitos..... 18

2.2.3. Maduración del ovocito..... 19

2.2.4. Medios de Maduración..... 20

2.2.5. Fertilización *in vitro* 21

2.2.6. Desarrollo embrionario temprano 23

2.2.7. Cultivo *in vitro* de embriones..... 24

2.2.8. Transporte de embriones 24

2.2.9. Transferencia de embriones 25

2.2.10. Diagnóstico de gestación..... 25

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 ZONA DE ESTUDIO	27
3.2 TIPO DE ESTUDIO	27
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA	27
3.4. PREPARACIÓN DE VACAS RECEPTORAS	28
3.5. TRANSPORTE DEL EMBRIÓN	28
3.6. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	29
3.7. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN	30
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
a. Factores cuantitativos de la preñez de embriones procedentes de FIV	32
b. Factores cualitativos de la preñez de embriones procedentes de FIV	34
b.1. Efecto de la ubicación de CL	34
b.2. Edad de la receptora	35
b.3. Efecto de la calidad de embrión	36
c. Modelo lineal generalizado sobre los factores en conjunto que afectan la preñez de embriones producidos in vitro	37
V. CONCLUSIONES	39
VI. RECOMENDACIONES	40
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS.....	49
ANEXOS ESTADÍSTICOS	49
ANEXOS FOTOGRÁFICOS	53

Área: Reproducción animal.

Tema: Tasa de preñez en vacas con embriones *in vitro*.

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 18 de marzo de 2019



INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Categorías de ovocitos según características de células de cumulus y citoplasma.....	18
Cuadro 2.	Distribución de hembras receptoras para la transferencia de embriones...	27



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores cuantitativos que intervienen en la preñez de embriones procedentes de producción in vitro	32
Tabla 2. Factores cuantitativos y cualitativos en conjunto que intervienen en la preñez de embriones procedentes de producción in vitro.....	37



ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1.	Efecto de la ubicación del CL (derecho e izquierdo) sobre la tasa de preñez con embriones procedentes de producción in vitro.	34
Gráfico 2.	Efecto de la edad de la receptora (DL, 2D, 4D, 6D y BLL) sobre la tasa de preñez con embriones procedentes de producción in vitro.	35
Gráfico 3.	Efecto de la calidad del embrión (G1 y G2) transferido sobre la tasa de preñez con embriones procedentes de producción in vitro.	36



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Envasado de embrión dentro la pajilla de 0.25 mL	29
Figura 2. Examen ginecológico y condición corporal	53
Figura 3. Producción de embriones in vitro y selección para la transferencia	53
Figura 4. Empajillado del embrión	53
Figura 5. Transporte de los embriones	53
Figura 6. Materiales de transferencia.....	54
Figura 7. Preparación de la receptora (anestesia epidural).....	54
Figura 8. Armado del aplicador para la transferencia de embriones.	54
Figura 9. Técnica de transferencia.....	55
Figura 10. Diagnóstico de gestación por ecografía.	55
Figura 11. Parto de una de las receptoras.	55



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- IVM: Maduración in vitro.
- ZP: Zona pelúcida.
- COCs: Complejo *cúmulus*-ovocito
- FIV: Fertilización in vitro
- BSA: Albúmina sérica bovina.
- PBS: solución buffer de fosfato
- PIV: producción in vitro de embriones
- SOFaa: medio cultivo con aminoácidos.
- TCM-199: Medio de cultivo de tejidos 199.
- TALP = Medio de capacitación espermática TALP
- TE: transferencia de embriones.
- CC: condición corporal.
- CL: cuerpo lúteo.
- NaCl: cloruro de sodio.
- U.I.: unidades internacionales.
- VG: vesícula germinal.
- L: litro
- COC: Complejo cumulus ovocito.
- ZP: zona pelúcida.
- ADN: ácido desoxiribonucleico.
- KSOM: medio simple optimizado con potasio.
- CO₂: anhídrido carbonico.
- uM: micromoles.
- mL: milímetro cubico.
- MHz: megahercios.
- BHBA: B-hidroxitirato.
- PGF₂ ∞ : prostaglandina.



RESUMEN

El objetivo fue determinar los factores que afectan la tasa preñez en vacas receptoras transferidas con embriones producidos *in vitro* en condiciones de altura. El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano Puno (producción de embriones *in vitro*) y la transferencia de embriones (TE) en el distrito de Macari utilizando 50 hembras receptoras (25 primíparas y 25 multíparas) de raza Brown Swiss, la producción de embriones que incluye desde la el transporte y colección de ovocitos, maduración, fertilización, cultivo y evaluación de embriones, manejo y evaluación de receptoras y finalmente el transporte y la TE; el análisis estadístico evaluó factores cuantitativas como condición corporal (CC), diámetro de cuerpo lúteo (CL), número de partos y factores cualitativos como lugar de transferencia (cuerno derecho o izquierdo), calidad de embrión estadísticamente fueron evaluadas mediante las pruebas de Wilcoxon y Chi cuadrado también se aplicó una regresión logística binaria para el estudio de los factores en conjunto en un solo modelo todos fueron procesados en el programa R 3.4.1. Se obtuvo mayor tasa de preñez cuando las receptoras tenían 2.65 ± 0.35 de CC, 19.54 ± 1.33 mm de diámetro de CL y en primíparas como factores cuantitativos y cuando se transfirió al cuerno ipsilateral izquierdo (9/12 preñadas) con embriones de grado 1 (G1: 11/17 preñadas) como factores cualitativos incremento la preñez; la regresión logística binaria no determinó significancia en conjunto; sin embargo, la calidad de embrión y número de partos muestran ser factores importantes que podrían influir sobre la tasa de preñez. En conclusión, para la selección de receptoras en un programa de TE con embriones producidos *in vitro* los factores a tener en cuenta son diámetro de CL, transferencia al lado izquierdo y transferir embriones de grado 1 en primíparas en condiciones de altura.

Palabras clave: embrión, *in vitro*, preñez, transferencia de embriones.



ABSTRACT

The objective was to determine factors affecting pregnancy rate in recipient cows transferred with embryos produced *in vitro* under high altitude conditions. The study was conducted in the Laboratory of Animal Reproduction of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the National University of the Altiplano Puno (in vitro embryo production) and embryo transfer (ET) in the district of Macari using 50 recipient females (25 primiparous and 25 multiparous) of Brown Swiss breed, embryo production that includes from the transport and collection of oocytes, maturation, fertilization, culture and evaluation of embryos, handling and evaluation of recipients and finally the transport and ET; The statistical analysis evaluated quantitative factors such as body condition (CC), corpus luteum diameter (CL), number of deliveries and qualitative factors such as place of transfer (right or left horn), embryo quality were statistically evaluated using the Wilcoxon and Chi-square tests; a binary logistic regression was also applied to study the factors as a whole in a single model; all were processed in the R 3 program. 4.1. A higher pregnancy rate was obtained when the recipients had 2.65 ± 0.35 CC, 19.54 ± 1.33 mm CL diameter and in primiparas as quantitative factors and when transferred to the left ipsilateral horn (9/12 pregnant) with grade 1 embryos (G1: 11/17 pregnant) as qualitative factors increased pregnancy; binary logistic regression did not determine overall significance; however, embryo quality and number of parturitions show to be important factors that could influence pregnancy rate. In conclusion, for the selection of recipients in an ET program with in vitro produced embryos, the factors to take into account are CL diameter, transfer to the left side and transfer of grade 1 embryos in primiparas in high altitude conditions.

Key words: embryo, embryo transfer, *in vitro*, pregnancy.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Para la producción de embriones in vitro se utilizan ovocitos aspirados de ovarios de vacas beneficiadas o aspirados de vacas en pie por OPU (aspiración folicular guiado por ultrasonografía). La producción de embriones in vitro consiste en aplicar sobre los ovocitos tres procedimientos: Maduración, fertilización y cultivo que conducen exclusivamente a producir embriones in vitro (Hasler, 2001). El uso de los ovocitos de los ovarios recogidos del matadero de vacas de alta genética, sirven para la producción de embriones in vitro, son una herramienta en programas de mejoramiento genético en ganado lechero, donde el costo por embrión producido es bajo (Wilson et al., 2005), mejor si se adiciona semen sexado con lo cual se producirían hembras de reemplazo (Blondin, 2017; Pontes et al., 2010). El 2011 de 318 000 embriones in vitro de producción mundial, Brazil utilizo el 86% de estos embriones en la transferencia de embriones (Hasler, 2014).

Las tasas de gestación seguido a la transferencia con embriones frescos o congelados se ven afectados por varios factores como la estación del año, vaca receptora, edad del embrión, estado y grado del embrión, sincronización del celo de la receptora (Hasler, 2001). Pero estas tasas de gestación en vacas receptoras son altas cuando se transfieren con embriones de producción in vivo que cuando se transfieren con embriones de producción in vitro (Pérez-Mora et al., 2020). Además, las tasas de gestación en las vacas receptoras se ven afectadas: Siendo mayor en primíparas que multíparas, grado del embrión 1 y 2 que 3 o 4, día de transferencia 7 que al 6 u 8 del ciclo estral, así como en vacas con metritis que son menores la tasa de gestación, mientras que el nivel de producción leche no afecta la tasa de gestación (Ferraz et al., 2016).



Diversos trabajos reportan la producción de embriones *in vitro*, de los folículos aspirados de los ovarios de vacas sacrificadas en los centros de beneficio (camal) y logrando gestaciones que van desde el 20 al 45% mediante el uso de la TE con estos embriones producidos *in vitro*, sobre todo en condiciones de estrés como sucede en verano en vacas de producción lechera (Al-Katanani et al., 2002; Block et al., 2010; Ferraz et al., 2016; Stewart et al., 1995). Por estas razones el presente estudio se planifico con los siguientes objetivos:

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los factores que afectan la tasa preñez en vacas receptoras transferidas con embriones producidos *in vitro* en condiciones de altura.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los factores cuantitativos que afectan la tasa de preñez en relación a las receptoras (condición corporal, diámetro del cuerpo lúteo, número de partos) transferidas con embriones producidos *in vitro*.
- Evaluar los factores cualitativos que afectan la tasa de preñez en relación a las receptoras y embrión transferido (ubicación de CL, edad de la receptora, calidad de embrión) producidos *in vitro*.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

La producción de embriones en vacunos juega un rol importante como modelo para la investigación de procesos genéticos, metabólicos y del desarrollo de embriones en otras especies (Gonella, AM; Holguín, G; Montaña, D; Valbuena, 2013). Las estadísticas sobre la producción de embriones *in vitro* en todo el mundo incremento de 42 000 anuales a 300 000 en los últimos 10 años siendo Brasil em país con mayor producción (Block et al., 2011). El porcentaje de producción de embriones *in vitro* en reportes realizados en Perú fueron de 30.5% con ovocitos provenientes de ovarios de matadero y de 20.8% de vacas donadoras con ovocitos obtenidos mediante aspiración folicular (Carlos Quispe et al., 2018). Los porcentajes de preñez alcanzado con embriones *in vitro* fueron con semen sexado de 41% (3627 embriones transferidos), con semen convencional fue de 42% (de 481 embriones transferidos) en condiciones de laboratorios desarrollados con alta tecnología (Colazo, MG; Mapletoft, 2007). Estudios reportan que la tasa de gestación en las hembras receptoras de embriones de producción *in vitro* fue del 25 al 36.8%, donde los ovocitos fueron colectados de hembras vivas por el método de aspiración folicular (Pontes et al., 2010; Siqueira et al., 2009). Mientras que embriones *in vitro* de aspiración de folículos de ovarios de vacas sacrificadas, al ser transferidos a las receptoras reportaron tasas de gestación en diferentes granjas desde el 20.4 al 50.3% de gestaciones (Al-Katanani et al., 2002; Block et al., 2010; Ferraz et al., 2016; Stewart et al., 1995).



2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Obtención de ovocitos

Existen diferentes técnicas de obtención de ovocitos ya sea en animales muertos o en animales vivos; la obtención de ovocitos de animales muertos se hace mediante la recolección de ovarios de vacas sacrificadas, esta técnica es una fuente más utilizada de bajo costo, provenientes de animales en diferentes estados del ciclo estral, que pueden ser madurados, crio preservados, fertilizados y cultivados in vitro hasta alcanzar estados avanzados de desarrollo embrionario (Gordon, 1996) y tienen los siguientes pasos.

a. Recolección de ovarios en los camales

En el matadero la recolección de ovarios se realiza mediante la intervención del recolector al inicio de la cadena de matanza, los ovarios se obtienen de vacas en diferentes estados fisiológicos dentro de un rango de 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales, al recogerlos son colocados en un termo que contiene solución salina (0.9% NaCL), o solución fosfato-tamponada salina (PBS) (Aller et al., 2015). Estas soluciones contienen generalmente, como antibióticos 25 mg/L de kanamicina, o 100 UI/L de penicilina y 100 ug/L de gentamicina (L. Leibfried & Science, 1982).

El traslado de los ovarios del centro de beneficio al laboratorio, se realiza desde los 30 minutos a las 6 h. después de la recolección a una temperatura de 30-35°C, ya en el laboratorio los ovarios son lavados repetidas veces en la solución de transporte, luego son colocados en baño maría a 30°C antes de proceder a la obtención de los ovocitos (Fry et al., 1997). Existen diversas técnicas para obtener ovocitos de ovarios provenientes de mataderos.



b. Disección folicular

Se selecciona ovarios que presenten folículos entre 2 y 8 mm, para la recuperación ovocitos, se requiere la disección de los folículos antrales intactos seguidos de una ruptura cuidadosa y controlada de los folículos sugeridos permitiendo obtener ovocitos morfológicamente aceptables con una mínima destrucción de las células del cumulus (Gordon, 1996).

c. Cortes ováricos

Esta técnica de cortes o slicing ovárico se puede aplicar directamente sobre los ovarios o aplicarla después de completar una aspiración pudiendo obtenerse el triple de ovocitos con relación a la técnica de aspiración folicular; en varias investigaciones se pudo concluir que esta técnica fue el mejor método para obtener grandes cantidades de ovocitos de ovarios de matadero, debido a que al cortar transversalmente el ovario no solo se obtienen los ovocitos de la superficie, sino que también se obtienen los ovocitos presentes en la sección cortical (Crocomo et al., 2012).

d. Aspiración folicular

Es la técnica más empleada en la recuperación ovocitaria en ovarios de matadero; sin embargo, se sabe que de todos los folículos aspirados sólo se recupera el 30 o 60% de ovocitos (Gordon, 1996). La ventaja de la absorción folicular se basa en la velocidad y la facilidad operacional, factor particularmente importante en una unidad comercial de producción de embriones, puede realizarse con agujas 18 a 22 G unidas con jeringas de 3 o 10mL (Sasamoto et al., 2003). La ***aspiración folicular por tranluminación*** es una técnica que asocia la aspiración folicular comúnmente conocida y el empleo de la luz guiada a través de una barra de plexiglás insertado en el hilio del ovario. Permite iluminar no solo los folículos presentes en la superficie



del ovario, sino también los presentes en la corteza del ovario, pudiendo aumentar el número de ovocitos colectados hasta un 50% por ovario, además los ovocitos obtenidos por esta técnica muestran un eficiente desarrollo *in vitro* (Arav, 2001).

2.2.2 Clasificación de los ovocitos

El primer método para clasificar entre ovocitos competentes e incompetentes para el desarrollo embrionario es la calidad de las envolturas celulares que rodean el ovocito (células del cumulus ophorus) y la apariencia del citoplasma son los mejores indicadores del potencial que el ovocito posee para la maduración y fertilización *in vitro* (Leibfried and Bavister, 1982).

Las células de los cúmulos son subpoblaciones de células de la granulosa las cuales proveen de nutrientes al ovocito durante el crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (Arlotto et al., 1996).

Los laboratorios establecen un tipo de clasificación para los ovocitos recuperados que se van a someter a procedimientos *in vitro*, pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de

Cuadro 1. Categorías de ovocitos según características de células de cumulus y citoplasma.

TIPO	Nro. De células del cumulus ophorus	Citoplasma
A	Capas múltiples, células compactas del cumulus (> 4)	Homogéneo y transparente
B	Capas múltiples, células compactas del cumulus (1 a 3)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
C	Ovocitos desnudados	Irregular con zonas oscuras



D	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras
---	--------------------	-----------------------------

Fuente: Lonergan et al., (1994)

2.2.3. Maduración del ovocito

Se divide en maduración nuclear y citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Martinez, 2002). El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial de LH, además de la reanudación de la meiosis, el pico de la LH desencadena cambios en el complejo cúmulus-ovocito (COCs) (Conti et al., 2006).

a. Maduración citoplasmática

Es un proceso donde ocurren cambios en el gameto femenino, que le confiere la capacidad para mantener viables los eventos de fecundación y las primeras etapas del desarrollo embrionario (Sasamoto et al., 2003). Se afirma que la maduración citoplasmática se lleva a cabo mediante la redistribución de las organelas citoplasmáticas, los cambios en la dinámica de los filamentos del citoesqueleto y una reprogramación de la síntesis proteica, así también la redistribución de las mitocondrias en la región periférica al citoplasma interno, una falla en esta redistribución produce una incompleta maduración citoplasmática y una reducción en el desarrollo de la competencia (Liu et al., 2010).

Sin embargo, existen sucesos que pueden influir en el éxito de la maduración in vitro (MIV) tales como: las condiciones de cultivo que no son capaces de sustentar la expresión de factores intrínsecos del desarrollo del ovocito;



los sistemas actuales de MIV que pueden inducir una asincronía en el progreso de la maduración nuclear y citoplasmática; o que el ovocito no tiene uno o más de los componentes necesarios para la maduración nuclear y citoplasmática (Richard, 2007a).

b. Maduración nuclear

La maduración nuclear empieza con la reanudación de la meiosis, dándose el paso de vesícula germinal (VG) a metafase de la segunda división meiótica (MII) esta conlleva a la disolución de la membrana nuclear conocida como “rotura de la vesícula germinal”, la formación del huso meiótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando entonces el estadio de metafase I (MI); para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la formación del primer corpúsculo polar (CP) y el paso del ovocito al estadio de MII (Richard, 2007b). La maduración nuclear culmina con la fusión de membranas entre el ovocito y el espermatozoide dando origen a la formación de los pronúcleos masculino y femenino (Huanca L. et al., 2014).

2.2.4. Medios de Maduración

Los medios de maduración deben reunir ciertas características para que la maduración se lleve a cabo de forma correcta, simulando las condiciones que el ovocito encontraría in vivo, para conseguir esto se utilizan distintos medios de maduración; uno de los más usados es el TCM-199, aunque también existen otros como el TALP, el B2 de Menezo que se adicionan con una serie de suplementos, siendo la acción de cada uno diferente, aunque todos persiguen el mismo fin (Dieleman et al., 2002).



2.2.5. Fertilización *in vitro*

Después de la maduración *in vitro*, los ovocitos se encuentran aptos para ser fertilizados *in vitro*; previo a la fertilización de los ovocitos, el semen debe estar capacitado y activado. La capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este penetrar y fecundar a los ovocitos (Shemesh, 2000).

a. Preparación del semen

Generalmente el semen utilizado para la fertilización *in vitro* procede de semen congelado, por tanto, la preparación incluye el lavado de las células espermáticas de los componentes del diluyente y crioprotectores, la separación de los espermatozoides móviles de los no móviles y la capacitación espermática (Parrish et al., 1988). Lavado del semen y separación de espermatozoides móviles y no móviles. Existen metodologías descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y estas son: Swim-up, gradiente de Percoll, lavado por centrifugación, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación; siendo el lavado por centrifugación el método más sencillo de todos (Risopatron et al., 1996).

b. Capacitación de los espermatozoides

La capacitación espermática involucra cambios bioquímicos en las membranas del espermatozoide, lo que permite la reacción acrosómica (Avery, B; Greve, 1995). En este proceso se produce retiro del material que recubre la región acrosómica del espermatozoide dejando libres a los receptores que interaccionan con las células del cúmulus, incremento del pH acrosomal, desequilibrio entre el colesterol y fosfolípidos y aumento en la permeabilidad al calcio (Shemesh, 2000). Para capacitar los espermatozoides, se emplean medios compuestos con heparina, calcio, células del epitelio oviductal y fosfolípidos vasoactivos; donde la heparina



capacita a las células espermáticas, mediante el desplazamiento de las proteínas descapacitantes de la membrana plasmática y la estimulación de la apertura de los canales de calcio (SALISBURY et al., 1982).

c. *Eventos durante la fertilización in vitro*

La fecundación es la interacción celular entre los gametos, que se unen para generar un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos padres, llevándose este en varios eventos de cascada (*Biología Del Desarrollo - Scott F. Gilbert - Google Libros, 2005*). La zona pelucida (ZP) contiene tres proteínas (ZP1, ZP2, ZP3), quienes actúan como receptores primarios y secundarios para que se dé la unión entre el ovocito y el espermatozoide; en primera instancia para la unión de gametos, la ZP3 se une al espermatozoide, produciéndose una reacción primaria, de tal manera que esto provoca la reacción acrosómica, donde la membrana acrosomal externa del espermatozoide se une con la membrana plasmática del ovocito, enseguida la membrana acrosomal interna interactúa con la proteína ZP2 produciendo así una reacción secundaria, activándose los espermatozoides liberando calcio intracelular, que lleva a la liberación de vesículas acrosómicas que contienen hialuronidasa y acrosina, estas enzimas permiten al espermatozoide atravesar la ZP, llegando al espacio perivitelino, donde la membrana plasmática post-acrosomal se fusiona con la membrana plasmática del ovocito, y de esta manera el espermatozoide se incorpora al citoplasma (Arenas, 2005).

El tiempo habitual de la fertilización in vitro (FIV) ocurre entre 18 h y 24 h, donde se ha visto resultados satisfactorios, la unión de los espermatozoides activa al ovocito, completando la MII y expulsando el segundo corpúsculo polar (CP), a partir del material genético haploide del espermatozoide y del ovocito se



van a formar los pronúcleos, que migran al centro de la célula, donde el ADN se duplica y ocurre la singamia, rompiéndose la membrana de los pronúcleos y por consiguiente los cromosomas se ensamblan en el huso mitótico, tornándose así el primer clivaje del nuevo individuo (Risopatron et al., 1996).

2.2.6. Desarrollo embrionario temprano

La segmentación o división embrionaria es un proceso después de la fecundación, los cigotos experimentan varias divisiones mitóticas, esta secuencia de duplicaciones continúa durante el resto del periodo de segmentación temprana, una vez que el embrión ha formado 16 blastómeros, se denomina mórula (Jainudeen, M; Wahid, H; Hafez, 2002).

La *mórula compacta*, es visible al quinto y sexto día de cultivo, donde el número de blastómeros es de aproximadamente de 32-64, los blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa solo el 60-70% del espacio perivitelino, durante esta etapa las células embrionarias cambian de esférica a una forma poligonal, a este fenómeno se denomina compactación, donde las células pueden comunicarse entre sí mediante uniones especiales, la compactación es una excelente señal de que el embrión se está desarrollando normalmente (Anema et al., 2010).

El *blastocisto temprano*, es visible a los siete días, el número de blastómeros es de 100-200 células; se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas o trofoblasto y por la formación de una cavidad llamada blastocele en el interior del embrión (Palma, 2008a).

El *blastocisto expandido*, visible entre al día siete y ocho del cultivo, con más de 200 células, el diámetro aumenta considerablemente, con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida; la presión creciente del blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su protrusión (Palma, 2008a). El



blastocisto protruido, visible al día ocho y nueve, con 200 a 800 células, los embriones han abandonado la zona pelúcida, puede ser esférica, con un blastocele bien definido o colapsado. Los blastocistos protruidos 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 mórulas compactas a blastocistos (Palma, 2008a).

2.2.7. Cultivo *in vitro* de embriones

Durante los días de desarrollo embrionario se realiza la evaluación en cada etapa, la cantidad evolucionada de embriones depende del estado de desarrollo de los mismos y estos a la vez con su medio de desarrollo (Palma, 2008b). Para obtener un buen cultivo de embriones es esencial conocer los medios de cultivo que de acuerdo a sus características se clasifican en tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y cocultivo con células somáticas; semidefinidos, cuando se omite el cocultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica y definidos cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona. Los medios simples más utilizados para el cultivo de los embriones bovinos son: fluido oviductal sintético, con base a los componentes encontrados en el fluido oviductal ovino y Potassium Simplex Optimized Medium KSOM.

2.2.8. Transporte de embriones

Los embriones producidos *in vitro* en el Laboratorio se tienen que transportar para realizar la transferencia a las receptoras entre las formas de transporte utilizados son: Utilizando viales con diferentes medios de cultivo y cubierto con aceite mineral, tapados y adicionados con CO₂ y el vial armado dentro de una incubadora portátil a 38°C (Katanani et al., 2002; Wilson et al. 2005; Pontes et al., 2010). En cambio, reportes indican que los embriones fueron transportados por 3 horas en pajillas de 0.25 mL con



PBS (solución fisiológica fosfatada) suplementada con el 0.2% de BSA (Seroalbumina bovina) a 37°C (Sequeira et al., 2009), otro investigador transporto los embriones cargados dentro la pajilla con el medio Hepes TALP suplementado con el 10% de suero fetal y 50 uM de dithiothreitol, dentro un incubador portátil a 38.5°C (Stewart et al., 2011). Para el transporte embriones de 7 días de producción in vitro en el estado de blastocito expandido y grado 1, llenaron en pajillas de 0.25 mL con el medio Hepes Talp suplementado con el 10% de suero fetal y 50 uM de dithiothreitol y transportados dentro una incubadora portátil a 38.5°C (Block et al., 2010).

2.2.9. Transferencia de embriones

Para la transferencia de embriones a las receptoras fueron administradas una inyección epidural con lidocaína al 2% (3 mL), realizaron en vacas sincronizadas sin detectar el celo, que de acuerdo a su protocolo el día 10 consideraron el celo y 17 realizaron la transferencia del embrión, donde previamente con ayuda del ecógrafo determinaron el diámetro del cuerpo lúteo (≥ 13 mm) y ubicación o la determinación del cuerpo lúteo realizaron por palpación rectal, para depositar el embrión en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo, para la transferencia utilizaron el método transcervical (Pontes et al., 2010; Siqueira et al., 2009; Stewart et al., 2011; Katanani et al., 2002). En cambio, otros investigadores la transferencia realizaron en control de celo natural a los 6, 7, 8 o 9 detectados el inicio del estro (Ferraz et al., 2016). Otro método es que las receptoras sincronizaron con el protocolo de Ovsynch-56 y la metodología de transferencia fue similar a los protocolos descritos por los autores anteriores (Block et al., 2010).

2.2.10. Diagnóstico de gestación

El diagnostico de gestación realizan con ayuda del ecógrafo a los 30 días determinando la vesícula embrionaria y confirmado a los 60 días (Pontes et al., 2010;), además que determinaron a los 30 días post transferencia el diámetro del cuerpo lúteo analizaron la



presencia de progesterona en las vacas gestantes (Sequeira et al., 2009), otros investigadores el diagnóstico de gestación realizaron por palpación rectal a partir de los 35 días y con ratificación a los 90 días (Stewart et al., 2011; Ferraz et al., 2016; Katanani et al., 2002; Block et al., 2010).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ZONA DE ESTUDIO

La producción de embriones *in vitro* fue realizada en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, mientras que la transferencia de embriones se realizó en vacas de los productores de leche localizados en el distrito de Macari pertenecientes a la provincia de Melgar (a 200 km de la ciudad de Puno), encontrándose a una altitud de 3970 msnm.

3.2 TIPO DE ESTUDIO

El estudio es clasificado según el control de la asignación de factores de estudio además que evaluó una serie de características en las vacas receptoras como *experimental*, según la secuencia temporal es un estudio del tipo *longitudinal* porque la toma de datos se dio a lo largo de periodo determinado.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Las unidades experimentales fueron 50 hembras receptoras entre vaquillonas y vacas cruzadas con la raza Brown Swiss, dicho número de animales fueron realizados mediante un *muestreo no probabilístico por conveniencia*. Los animales tuvieron un manejo con un sistema de manejo extensivo y con alimentación mixta de pastos naturales y cultivados propia de los pequeños y medianos productores.

Cuadro 2. Distribución de hembras receptoras para la transferencia de embriones

Vacas (multíparas)	Vaquillonas (nulíparas)
25	25



- **Factores de inclusión:** Hembras con presencia de ciclos estrales normales, además en vacas con parto normal.
- **Factores de exclusión:** Hembras con presencia de secreciones vaginales anormales.

3.4. PREPARACIÓN DE VACAS RECEPTORAS

Para la **selección de las receptoras** (vaquillonas y vacas) se realizó el control de un ciclo estral completo, realizando un examen ginecológico evaluando la no presencia de secreciones vaginales tanto a la palpación rectal como a la ultrasonografía determinando: simetría de cuernos uterino, evaluación de estructuras ováricas.

Previamente se coordinó con el Laboratorio el inicio de la producción de embriones *in vitro* teniendo en cuenta los siguientes pasos previos:

- **Día 0:** Inicio de la producción de embriones: maduración de ovocitos (embriones *in vitro*).
- **Día 1:** Control de celo de la hembra receptora que fue un día después del inicio de la producción de embriones (día 0).
- **Día 6:** Se realizó la evaluación mediante palpación rectal y ecográfica para tomar las características ultrasonográficas del cuerpo lúteo (tamaño y ubicación); todos estos procesos un día antes de la transferencia de embriones.

3.5. TRANSPORTE DEL EMBRIÓN

Los embriones seleccionados en el laboratorio fueron de grado 1 y 2 (Stringfellow, D; Givens, 2011) para que puedan ser transportados para el día de la transferencia, los mismos que se prepararon de la siguiente manera:

- Previamente al medio SOFaa se le suplementó el 20% de suero fetal bovino.

- La pajilla vacía de 0.25 mL fue identificada colocando, la fecha, la calidad del embrión indicando el grado del embrión (1 o 2).
- Dentro una pajilla de 0.25 mL se absorbió 10 mm de medio (SOFaa), espacio de aire 5 mm, 10 mm de medio, 5 mm de aire, 50 mm de medio más el embrión, 5 mm de aire, 10 mm de medio (Fig.1).

Tapón anterior	Aire 5mm	Medio 10 mm	Aire 5mm	Medio + embrión 50 mm	Aire 5mm	Medio 10 mm	Aire 5mm	Medio 10mm	Tapón posterior
----------------	----------	-------------	----------	-----------------------	----------	-------------	----------	------------	-----------------

Figura 1. Envasado de embrión dentro la pajilla de 0.25 mL

- Este contenido total se absorbió para fijar por el contacto de los 10 mm de medio con el tapón posterior de la pajilla.
- Finalmente, en la pajilla envasado y la parte abierta se colocó cloruro de polivinilo que al contacto con la humedad se solidifica y que sirvió de tapón.
- La (s) pajilla (s) envasadas fueron envueltas en papel toalla y colocadas en forma horizontal dentro un Tecnopor pequeño (largo= 20 cm, ancho= 11.5 cm y alto 7.5 cm) y transportadas al menos por un tiempo de 4 h hasta el lugar, para realizar la transferencia de embriones en las receptoras; mantenidos a una temperatura promedio de entre 20 y 25°C.

3.6. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

El procedimiento de transferencia se realizó según recomendaciones de diversos autores (Stringfellow, D; Givens, 2011) Al llegar al lugar y al establo de propietario, donde la vaca receptora que fue examinada el día anterior se realizó la transferencia del embrión de la siguiente manera:

- La vaca receptora se fijó en un brete provisional armada con troncos para realizar el manejo durante la transferencia. Seguidamente se rasuró un área



entre la articulación sacro-coccígea y previa asepsia se colocó 4 mL de anestesia local (2% de lidocaína), con la finalidad de relajar el tracto genital de la receptora.

- Con una mano enguantada con guante obstétrico se introdujo al recto de la receptora con la finalidad de vaciar las heces e higienizar la región perianal con agua y jabón, finalmente se secó la zona higienizada.
- El armado de la pajilla con el embrión se realizó con un aplicador de transferencia de embriones, cortando el tapón de polivinilo de cloruro, colocando la pajilla en el interior del aplicador, protegiendo y asegurando con una funda de TE; finalmente, el aplicador se protegió con una camiseta sanitaria.
- Seguidamente se introdujo la mano por el recto de la receptora y con ayuda de un auxiliar (dueño) se abrió los labios vulvares de la receptora, para insertar el aplicador de TE, una vez el aplicador en la vagina, la camiseta sanitaria que protegía fue eliminada aplicando una presión adecuada.
- Finalmente, la punta del aplicador se dirigió hacia la apertura cervical y con ligeros movimientos suaves se superó los anillos cervicales, se continuo el pasaje del aplicador hasta aproximadamente el tercio anterior del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, donde se depositó el embrión a una ubicación lo más anterior posible.

Etapas de diagnóstico de gestación

3.7. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

El diagnóstico de gestación fue realizado primeramente por la evaluación de tasa de no retorno de celo, sumando la ultrasonografía realizada con un equipo SonoStar SS8® con un transductor lineal para el examen transrectal a una frecuencia de 6.5 MHz en modo



B, donde se pudo observar la embrión como una estructura con cierta ecogenicidad en comparación a los líquidos amniótico y alantoideo (estructuras anecogénicas) característica; este examen se realizó a los 30 y 60 días post transferencia del embrión en todas las receptoras.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados según sus características teniendo variables cualitativas y cuantitativas, estas últimas fueron sometidas a estadísticas descriptiva (promedio, desviación estándar, coeficiente de variabilidad) posteriormente a los supuestos de normalidad y homocedasticidad (resultados significativos: por tanto se concluye que los datos no se distribuyen normalmente), seguido a este proceso se sometieron a una prueba no paramétrica de Wilcoxon las variables: condición corporal, diámetro del CL y número de partos en relación a la preñez y no preñez; las variables cualitativas (ubicación del CL, edad de la receptora, calidad del embrión) fueron sometidas a la prueba de Chi cuadrado para determinar la existencia o no de significancia en relación a preñez y no preñez; finalmente para la evaluación de los factores que afectan al éxito (preñez) tras la transferencia con embriones producidos *in vitro* se procedió con una regresión logística con las variables (cuantitativas y cualitativas) antes mencionadas; todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico R 3.5.1 con el paquete Rcmdr (R Core, 2018).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de gestación del 26% fueron divididos en factores cuantitativos y cualitativos tanto desde el punto de vista de receptoras y de embriones que se describen a continuación:

a. Factores cuantitativos de la preñez de embriones procedentes de FIV

La tabla 01 muestra los factores cuantitativos que intervienen sobre la preñez en embriones que fueron producidos mediante la producción in vitro, como son la condición corporal, el diámetro del cuerpo lúteo (CL) y el número de partos todas estas características en relación a las receptoras.

Tabla 1. Factores cuantitativos que intervienen en la preñez de embriones procedentes de producción in vitro

	n	Preñez	No Preñez	Valor de p
Condición corporal (1-5)	50	2.65 ± 0.35	2.32 ± 0.44	0.022
Diámetro de CL (mm)	50	19.54 ± 1.33	16.86 ± 2.47	0.00004
Número de partos	50	1.00 ± 1.29	3.12 ± 1.33	0.00009

Las tres características descritas muestran diferencia estadística a ser sometidas a una prueba no paramétricas; observando que las vacas que preñaron tuvieron en promedio 2.65 de condición corporal (CC) versus un 2.32 de CC, en el grupo de no preñez se observa una superioridad en el diámetro de CL en vacas con preñez en comparación a no preñez siendo de 19.54 mm y 16.86 mm respectivamente. En cuanto al número de partos



observamos que aquellas que preñaron tuvieron solo 1 parto en promedio y el grupo de no preñez reportan en promedio 3.12 partos.

Las diferencia observada en la *condición corporal* entre receptoras con preñez versus no preñez se debe a que la recomendación de condición corporal en receptoras de aptitud lechera debe estar entre 3 y 4 (Lamb and Mercadante, 2014) encontrándose una condición corporal cercana a 3 en aquellas receptoras que preñaron, en un estudio de inseminación artificial se observó que aquellas hembras con CC baja (menor a 2.5) presentan una alta incidencia de regresión lútea con consiguiente pérdida de preñez (Gümen et al., 2003), otros autores también reportan una mayor tasa de preñez (53 y 55%) en receptoras con condiciones intermedias (2 y 3) que receptoras con CC extremas de 1 a 4 (44 y 47%) con embriones producidos *in vitro* (Oyuela, LA; Jiménez, 2010), razón probable de la no preñez en hembras con menor CC del estudio.

La diferencia encontrada en el *diámetro de CL* indica que las receptoras con mayor diámetro exhiben una mayor preñez debido a la relación directa entre mayor diámetro y mayor producción de Progesterona hormona encargado del mantenimiento de la preñez (Filho et al., 2010; Oyuela, LA; Jiménez, 2010; Rigoglio et al., 2013) de la misma forma un CL de mayor diámetro genera una mayor vascularización del mismo, característica evaluada mediante ecografía Doppler lo que genera una mayor funcionalidad del CL de receptoras de embriones producidos *in vitro* del presente estudio (Pinaffi et al., 2015).

Finalmente el *número de partos* también es una característica significativa al comparar receptoras con un parto versus más de dos partos observando preñez en hembras jóvenes, resultados similares reportan otros autores alcanzando en nulíparas y primíparas porcentajes de preñez de 42 y 37.8% respectivamente contra un 31.6% en multíparas

(Ferraz et al., 2016) en líneas generales el mayor número de partos y edad disminuyen la posibilidad de éxito de preñez (sea por inseminación artificial o transferencia de embriones) debido a cambios variables de metabolitos entre el que destaca el aumento del β -hidroxibutirato (BHBA) en vacas multíparas alterando la expresión de genes que están relacionados con la proliferación y metabolismo de ácidos grasos en la células de la granulosa que a su vez reducen la síntesis de estradiol y progesterona (Schuermann et al., 2019; Stangaferro et al., 2018).

b. Factores cualitativos de la preñez de embriones procedentes de FIV

b.1. Efecto de la ubicación de CL

El gráfico 1 muestra la cantidad de receptoras que presentaban el CL en el lado derecho que fue de 29 de los cuales 4 quedaron preñadas mientras que las receptoras que presentaron CL en el lado izquierdo fueron de 21 quedando preñada 9 de ellas.

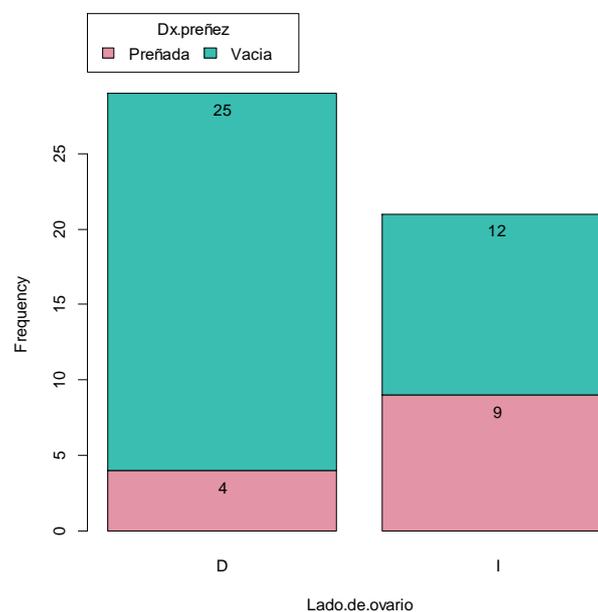


Gráfico 1. Efecto de la ubicación del CL (derecho e izquierdo) sobre la tasa de preñez con embriones procedentes de producción in vitro.

La relación que existe entre la mayor preñez de vacas receptoras fue aquellas que presentaron CL en el lado izquierdo en comparación que aquellas hembras que

presentaron su CL en el lado derecho ($p=0.02075$) o también denominado por otros autores como sitio o lugar de transferencia, resultados contrarios reportan observando un ligero incremento de la preñez cuando el embrión fue transferido cuando el CL estaba presente en el lado izquierdo con 42.2% y lado derecho de 37% en embriones producidos *in vivo* (Alkan et al., 2020).

b.2. Edad de la receptora

El gráfico 2. Muestra la clasificación de la edad de las receptoras en relación a su mayor o menor preñez según sea el caso observando 3 preñeces de 3 hembras transferidas en el grupo de dientes de leche (DL), en 2 dientes (2D) se obtuvo 3 preñeces de 4 vacas transferidas, en grupo de 4 dientes (4D) 3 preñadas de 9 hembras transferidas, para 6 dientes (6D) se reporta 2 preñeces de 9 vacas transferidas finalmente para el grupo boca llena (BLL) se reportan 2 preñeces de 25 vacas transferidas.

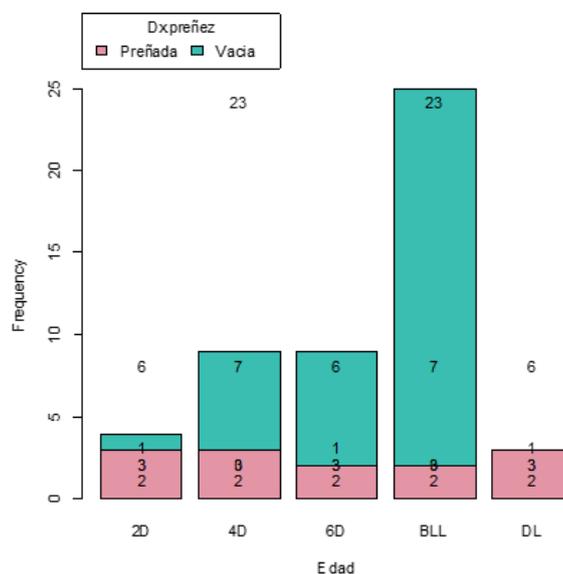


Gráfico 2. Efecto de la edad de la receptora (DL, 2D, 4D, 6D y BLL) sobre la tasa de preñez con embriones procedentes de producción *in vitro*.

El análisis realizado a esta característica con variables cualitativas permite indicar que existe alta evidencia de que las hembras receptoras clasificadas como DL y 2D

reportan tasa de preñeces superiores en comparación a las demás edades de las receptoras (4D, 6D y BLL) respectivamente que puede ser demostrado estadísticamente observando una dependencia de la menor edad de las receptoras a la mayor preñez ($p=0.001202$).

b.3. Efecto de la calidad de embrión

El gráfico 3 muestra la proporción de hembras receptoras preñadas posterior a la transferencia de embriones producidos *in vitro* siendo para aquellas clasificadas como de grado 1 (G1) 11 preñeces de 28 hembras transferidas, mientras que para los embriones clasificados como grado 2 (G2) fue de 2 preñeces de 22 hembras transferidas.

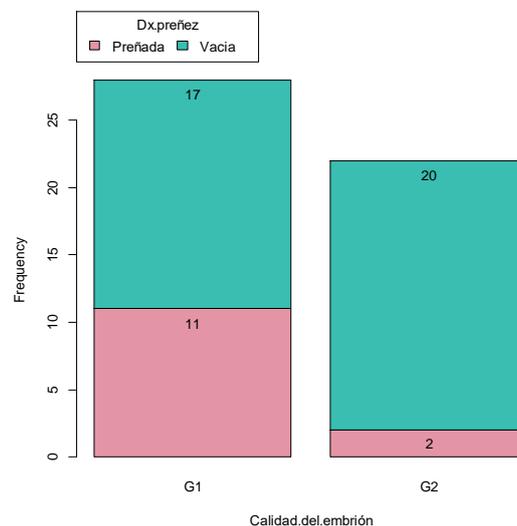


Gráfico 3. Efecto de la calidad del embrión (G1 y G2) transferido sobre la tasa de preñez con embriones procedentes de producción *in vitro*.

La mayor cantidad de preñez posterior a la transferencia con embriones producidos *in vitro* fue mayor cuando se utilizó embriones de mejor calidad clasificado como G1 comparado al grupo de embriones de menor calidad denominado G2 con evidencia estadística significativa ($p=0.01568$) en el presente estudio solo se realizó la transferencia de los embriones de grado 1 y 2 puesto que según sus características morfológicas son las más adecuadas para la transferencia (Palma, 2008a). El porcentaje

de preñez fue de 26% con embriones G1 y G2 respectivamente resultados inferiores a los reportado por otros autores quienes reportan 42.2 y 32.8%, 44.66 y 33.07% para G1 y G2 respectivamente (Bó and Mapletoft, 2013; Ferraz et al., 2016); sin embargo, similares en el sentido que los mayores porcentajes se obtuvo con el G1 y fue disminuyendo a medida que la calidad de embrión disminuye debido a que los embriones con buen desarrollo se muestran más resistentes a la mortalidad produciendo mayor cantidad de interferón tau importante para el reconocimiento de preñez continuando su desarrollo embrionario y evitando la liberación de Prostaglandina F2 α (PGF2 α) que podría generar luteolisis (Alkan et al., 2020; Carter et al., 2008).

c. Modelo lineal generalizado sobre los factores en conjunto que afectan la preñez de embriones producidos in vitro

La tabla 02 muestra los factores cuantitativos y cualitativos que intervienen en la preñez o no preñez a hembras receptoras a las que fueron transferidas embriones producida *in vitro* mediante un modelo lineal generalizado (debido a que los datos no poseían el supuesto de homocedasticidad).

Tabla 2. Factores cuantitativos y cualitativos en conjunto que intervienen en la preñez de embriones procedentes de producción in vitro.

	Estimado	Error Estándar	Valor de z	Valor p
Intercepto	0.643	3.5283	0.182	0.855
Calidad de embrión	1.8061	1.2129	1.489	0.136
Condición corporal	-0.6002	1.2794	-0.469	0.639
Diámetro de CL	17.0283	2243.3558	0.008	0.994
Edad de la receptora	0.6666	1.5642	0.426	0.67
Lado del ovario	-1.1711	1.0245	-1.143	0.253
Número de partos	0.7522	0.4605	1.634	0.102



El desarrollar un modelo lineal generalizado permite determinar en conjunto todos los factores que afectan la preñez en un solo modelo, de los cuales observamos que ninguno muestra diferencia estadística, lo que permite indicar que de forma conjunto no afectan sobre la mayor o menor preñez desde el punto de vista estadístico. Sin embargo, observamos que la calidad de embrión ($p=0.136$) y Número de partos ($p=0.102$) se encuentran cercanos a ser significativos ($p<0.05$) ello es corroborado con el *odds ratio* de ambas características siendo de 6.09 para calidad embrión que indica que los embriones de G1 tienen una probabilidad de 6.09 mayor de producir preñez que al transferir un embrión de G2, de la misma forma receptoras primípara o nulíparas tiene un 2.12 más probabilidad de preñar que al transferir embriones en receptoras multíparas; por tanto, desde el punto de vista fisiológico y biológico estas dos características pueden ser de importancia cuando se realiza la transferencia de embriones producido *in vitro* en condiciones de altura en pequeños y medianos productores a nivel de campo.



V. CONCLUSIONES

- La tasa de preñez en las vacas receptoras posterior a la transferencia de embriones de producción *in vitro* fue el 26% en condiciones de altura y de pequeños productores.
- Los factores cuantitativos de importancia son la condición corporal habiendo mayor preñez de aquellas con más de 2.65 de puntaje; el diámetro del CL mayor a 19.54 mm genera mayor porcentaje de preñez al igual que el número de partos observando mayores preñeces en vaquillas y vaquillonas en comparación a vacas.
- Los factores cualitativos de importancia muestran una mayor preñez cuando el CL estuvo ubicado al lado izquierdo, en animales categorizadas en edades de dientes de leche (DL) y dos dientes (2D) y finalmente el grado 1 de embrión genera mayor preñez que el grado 2.



VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar como vacas receptoras para la transferencia de embriones de producción *in vitro* vacas primíparas, condición corporal mayor a 2.65 y utilizar embriones de grado 1.
- Seguir evaluando las preñeces con la aplicación de transferencia de embriones producidos *in vitro*, como una biotecnología alternativa en vacas con baja fertilidad (mediante la obtención de ovocitos por aspiración folicular).



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Katanani, Y.M., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Krininger, C.E., Block, J., Thatcher, W.W., Hansen, P.J., 2002. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 58, 171–182.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00916-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00916-0)

Alkan, H., Kardeşahin, T., Dursun, Ş., Satılmış, F., Erdem, H., Güler, M., 2020. Evaluation of the factors that affect the pregnancy rates during embryo transfer in beef heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 55, 421–428.
<https://doi.org/10.1111/rda.13623>

Aller, J.F., Abalos, M.C., Acuña, F., Virgili, R., Requena, F., Cancino, A.K., 2015. Birth of live llama (*Lama glama*) derived from embryo transfer storage at 5°C for 24h. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.10.007>

Anema, J.L., Graham, J.K., Lenz, R.W., Seidel, G.E., 2010. *Reproduction, Fertility and Development* \r. Proc. Annu. Conf. Int. Embryo Transf. Soc. 22.

Arav, A., 2001. Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology*.

Arenas, M., n.d. *Fundamentos de reproducción* [WWW Document]. 2005. URL <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=YHQuuaXdTisC&oi=fnd&pg=PA23&dq=Fecundación+y+desarrollo+en+mamíferos,+Fertilidad+y+reproducción+asistida+Editorial+medica+panamericana+&ots=6fZcw9AZwe&sig=8DEcx8ylnzYas4KKj1bZmgmOynw#v=onepage&q&f=false> (accessed 2.7.21).

Arlotto, T., Schwartz, J.L., First, N.L., Leibfried-Rutledge, M.L., 1996. *Aspects of*



- follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45, 943–956. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00024-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00024-6)
- Avery, B; Greve, T., 1995. Impact of PercollR on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*.
- Block, J., Bonilla, L., Hansen, P.J., 2010. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium 1. *J. Dairy Sci.* 93, 5234–5242. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3443>
- Block, J., Hansen, P.J., Loureiro, B., Bonilla, L., 2011. Improving post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro: Actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology* 76, 1602–1609. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.025>
- Blondin, P., 2017. Logistics of large scale commercial IVF embryo production. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 32–36. <https://doi.org/10.1071/RD16317>
- Bó, G.A., Mapletoft, R.J., 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.* 54, 344–348. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/rd07204>
- Carlos Quispe, E., Edith Ancco, G., Juan Solano, A., Ide Unchupaico, P., Edwin Mellisho, S., 2018. Embryonic development capacity of bovine oocytes aspirated by ovum pick-up and from slaughterhouse ovaries. *Rev. Investig. Vet. del Peru* 29, 1114–1121. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14418>
- Carter, F.A., Forde, N.A., Duffy, P.A., Wade, M.A., Fair, T.A., Crowe, M.A.A., Evans, A.C.O.A., Kenny, D.A.A., Roche, J.F.A., Lonergan, P.A., 2008. Effect of



increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers 368–375.

Colazo, MG; Mapletoft, R., 2007. Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Cienc. Vet.* 9, 20–37.

Conti, M., Hsieh, M., Park, J.-Y., Su, Y.-Q., 2006. Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. *Mol. Endocrinol.* 20, 715–723.

<https://doi.org/10.1210/me.2005-0185>

Crocomo, L.F., Filho, W.C.M., Alvarenga, F.C.L., Bicudo, S.D., 2012.

Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Rev. Bras. Reprod. Anim* 25–31.

Dieleman, S.J., Hendriksen, P.J.M., Viuff, D., Thomsen, P.D., Hyttel, P., Knijn, H.M., Wrenzycki, C., Kruip, T.A.M., Niemann, H., Gadella, B.M., Bevers, M.M., Vos, P.L.A.M., 2002. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos, in:

Theriogenology. Elsevier, pp. 5–20. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00655-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00655-0)

Ferraz, P.A., Burnley, C., Karanja, J., Viera-Neto, A., Santos, J.E.P., Chebel, R.C., Galvão, K.N., 2016. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology* 86, 1834–1841.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.032>

Filho, M.F.S., Crespilho, A.M., Santos, J.E.P., Perry, G.A., Baruselli, P.S., 2010.

Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with



- progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.* 120, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.007>
- Fry, R., Niall, E., Simpson, T., Squires, T., Theriogenology, J.R.-, 1997, U., 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*.
- Gilbert, S., n.d. *Biología del desarrollo*, 1995.
- Gonella, AM; Holguín, G; Montaña, D; Valbuena, D., 2013. Corpus luteum diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate : data analysis from 17 , 521 embryo transfers from a commercial in vitro bovine embryo production program. *Anim. Reprod.* 10, 106–111.
- Gordon, I., 1996. Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos. sidalc.net.
- Gümen, A., Guenther, J.N., Wiltbank, M.C., 2003. Follicular Size and Response to Ovsynch Versus Detection of Estrus in Anovular and Ovular Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86, 3184–3194. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73921-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73921-6)
- Hasler, J.F., 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 81, 152–169.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Hasler, J.F., 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56, 1401–1415. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00643-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00643-4)
- Huanca L., W., Condori P., R., Chileno M., M., García H., P., Cainzo C., J., Becerra G., J.J., 2014. Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y



- division posfecundacion in vitro de ovocitos de alpaca. *Rev. Investig. Vet. del Peru* 25, 468–476. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782>
- Jainudeen, M; Wahid, H; Hafez, S., 2002. Ovejas y cabras, in: Hafez S. *Reproducción e Inseminación Artificial En Animales*. Mexico, pp. 12:177-187.
- Lamb, G.C., Mercadante, V.R.G., 2014. Selection and Management of the Embryo Recipient Herd for Embryo Transfer, in: *Bovine Reproduction*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 723–732.
<https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch78>
- Leibfried, L., Science, N., 1972. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. academic.oup.com.
- Leibfried, M., Bavister, B., 1982. Effects of epinephrine and hypotaurine on in-vitro fertilization in the golden hamster. *J. Reprod. Fertil.* 66, 87–93.
<https://doi.org/10.1530/JRF.0.0660087>
- Liu, S., Li, Y., Feng, H.L., Yan, J.H., Li, M., Ma, S.Y., Chen, Z.J., 2010. Dynamic modulation of cytoskeleton during in vitro maturation in human oocytes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 203, 151.e1-151.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.05.011>
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., Gordon, I., 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 48–53.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080370107>
- Martinez, B., 2002. *Estudio de la fecundación" in vitro" en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción" in vitro" de embriones*. Universidad de Complutense, Madrid.



- Oyuela, LA; Jiménez, C., 2010. Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Rev. la Fac. Med. Vet. y Zootec.* 57, 191–200.
- Palma, G., 2008a. Evaluación morfológica de los embriones bovinos, in: *Reprobiotec (Ed.), Biotecnología de La Reproducción.* Mar del Plata, pp. 237–247.
- Palma, G., 2008b. Transferencia de embriones bovinos y comunicación embriomaterna, in: *Biotecnología de La Reproducción. ReporBiotec,* Mar del Plata, pp. 251–268.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A., First, N.L., 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171–1180.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
- Pérez-Mora, A., Segura-Correa, J.C., Peralta-Torres, J.A., 2020. Factors associated with pregnancy rate in fixed-time embryo transfer in cattle under humid-tropical conditions of Mexico. *Anim. Reprod.* 17, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0007>
- Pinaffi, F.L.V., Santos, É.S., da Silva, M.G., Filho, M.M., Madureira, E.H., Silva, L.A., 2015. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle1. *Pesqui. Vet. Bras.* 35, 470–476. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000500015>
- Pontes, J.H.F., Silva, K.C.F., Basso, A.C., Rigo, A.G., Ferreira, C.R., 2010. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm 74, 1349–1355.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>
- R Core, T., 2018. R: a language and environment for statistical computing R.
- Richard, F.J., 2007a. Regulation of meiotic maturation1. *J. Anim. Sci.* 85, E4–E6.



<https://doi.org/10.2527/jas.2006-475>

Richard, F.J., 2007b. Regulation of meiotic maturation1. *J. Anim. Sci.* 85, E4–E6.

<https://doi.org/10.2527/jas.2006-475>

Rigoglio, N.N., Fátima, L.A., Hanassaka, J.Y., Pinto, G.L., Machado, A.S.D., Gimenes, L.U., Baruselli, P.S., Rennó, F.P., Moura, C.E.B., Watanabe, I., Papa, P.C., 2013.

Therigenology Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Therigenology* 79, 673–679.

<https://doi.org/10.1016/j.therigenology.2012.11.023>

Risopatron, J., Sanchez, R., Sepulveda, N., *Therigenology*, P.P.-, 1996, U., 1996.

Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparison with washing/centrifugation. Elsevier.

SALISBURY, G., VAN DER MACK, L., LODGE, J., 1982. Fisiología de la

Reproducción Animal e inseminación Artificial de los Bóvidos., 2da Ed. ed.

Editorial Acribia, Zaragoza.

Sasamoto, Y., Sakaguchi, M., Katagiri, S., Yamada, Y., Takahashi, Y., 2003. The

Effects of Twisting and Type of Aspiration Needle on the Efficiency of

Transvaginal Ultrasound-Guided Ovum Pick-Up in Cattle. *J. Vet. Med. Sci* 65,

1083–1086.

Schuermann, Y., Welsford, G.E., Nitschmann, E., Wykes, L., 2019. Association

between pre-breeding metabolic profiles and reproductive performance in heifers and lactating dairy cows. *Therigenology*.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.therigenology.2019.03.018>

Shemesh, M., 2000. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in



transgenic offspring. Wiley Online Libr.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200006\)56:2+<306::AID-MRD21>3.0.CO;2-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2+<306::AID-MRD21>3.0.CO;2-3)

Siqueira, L.G.B., Torres, C.A.A., Souza, E.D., Monteiro, P.L.J., Arashiro, E.K.N.,

Camargo, L.S.A., Fernandes, C.A.C., Viana, J.H.M., 2009. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine

recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology* 72, 949–958. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.013>

Stangaferro, M.L., Wijma, R.W., Masello, M., Thomas, M.J., Giordano, J.O., 2018.

Extending the duration of the voluntary waiting period from 60 to 88 days in cows

that received timed artificial insemination after the Double-Ovsynch protocol

affected the reproductive performance , herd exit dynamics , and lactation

performance of dairy. *J. Dairy Sci.* 1–19. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13046>

Stewart, R.E., Spicer, L.J., Hamilton, T.D., Keefer, B.E., 1995. Effects of Insulin-Like

Growth Factor I and Insulin on Proliferation and on Basal and Luteinizing

Hormone-Induced Steroidogenesis of Bovine Thecal Cells : Involvement of

Glucose and Receptors for Insulin-Like Growth Factor I and Luteinizing Hormone

1 , 2. *Journ a l Anim. Sci.* 3719–3731.

Stringfellow, D; Givens, D., 2011. Manual de la Sociedad Internacional de

Transferencia de Embriones, 4°ed. ed. Society International Embryo Transfer,

Illinois, EEUU.

Wilson, R.D., Weigel, K.A., Fricke, P.M., Rutledge, J.J., Matthews, D.L., Schutzkus,

V.R., 2005. In Vitro Production of Holstein Embryos Using Sex-Sorted Sperm and

Oocytes from Selected Cull Cows 776–782.



ANEXOS

ANEXOS ESTADÍSTICOS

> summary(GLM.4)

Call:

glm(formula = Dx.preñez ~ Calidad.del.embrión + CC + Diametro.de.CL +

Edad + Lado.de.ovario + n°.Partos, family = binomial(logit),

data = Dataset)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.05024	-0.32339	0.00008	0.36071	1.40655

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	0.6430	3.5283	0.182	0.855
Calidad.del.embrión[T.G2]	1.8061	1.2129	1.489	0.136
CC	-0.6002	1.2794	-0.469	0.639
Diametro.de.CL[T.CLp]	17.0283	2243.3558	0.008	0.994
Edad[T.Vaquilla]	0.6666	1.5642	0.426	0.670
Lado.de.ovario[T.I]	-1.1711	1.0245	-1.143	0.253
n°.Partos	0.7522	0.4605	1.634	0.102

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 57.306 on 49 degrees of freedom

Residual deviance: 29.443 on 43 degrees of freedom

AIC: 43.443

Number of Fisher Scoring iterations: 18



> exp(coef(GLM.4)) # Exponentiated coefficients ("odds ratios")

	(Intercept) Calidad.del.embrión[T.G2]		CC
Diametro.de.CL[T.CLp]		Edad[T.Vaquilla]	Lado.de.ovario[T.I]
	1.9021522	6.0864530	0.5487089
	24848447.6663151	1.9476308	0.3100102
n°.Partos			
	2.1217155		

Resúmenes de condición corporal

mean sd IQR 0% 25% 50% 75% 100% CC:n

Preñada 2.646154 0.3526457 0.5 2.0 2.5 2.8 3.0 3 13

Vacia 2.324324 0.4361482 0.5 1.5 2.0 2.5 2.5 3 37

t.test(CC~Dx.preñez, alternative='two.sided', conf.level=.95, var.equal=FALSE,
data=Dataset)

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: CC by Dx.preñez

W = 341, p-value = 0.02179

alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

> wilcox.test(Diametro.de.CL ~ Dx.preñez, alternative="two.sided", data=Dataset)

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: Diametro.de.CL by Dx.preñez

W = 399.5, p-value = 0.0003849

alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: n°.Partos by Dx.preñez

W = 67, p-value = 0.00009587



alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Frequency table:

Lado.de.ovario

Dx.preñez D I

Preñada 4 9

Vacia 25 12

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 5.3475, df = 1, p-value = 0.02075

Frequency table:

Calidad.del.embrión

Dx.preñez G1 G2

Preñada 11 2

Vacia 17 20

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 5.8381, df = 1, p-value = 0.01568

Expected counts:

Calidad.del.embrión

Dx.preñez G1 G2

Preñada 7.28 5.72

Vacia 20.72 16.28

Frequency table:

Edad



Dx.preñez 2D 4D 6D BLL DL

Preñada 3 3 2 2 3

Vacia 1 6 7 23 0

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 18.058, df = 4, p-value = 0.001202

Expected counts:

Edad

Dx.preñez 2D 4D 6D BLL DL

Preñada 1.04 2.34 2.34 6.5 0.78

Vacia 2.96 6.66 6.66 18.5 2.22

ANEXOS FOTOGRÁFICOS



Figura 2. Examen ginecológico y condición corporal



Figura 3. Producción de embriones in vitro y selección para la transferencia



Figura 4. Empajillado del embrión



Figura 5. Transporte de los embriones



Figura 6. Materiales de transferencia



Figura 7. Preparación de la receptora (anestesia epidural).



Figura 8. Armado del aplicador para la transferencia de embriones.



Figura 9. Técnica de transferencia



Figura 10. Diagnóstico de gestación por ecografía.



Figura 11. Parto de una de las receptoras.