



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO EXPERIMENTAL

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN VACAS
DONADORAS SUPEROVULADAS EN RELACIÓN A LA CALIDAD
EMBRIONARIA”**

Trabajo Experimental presentado previo a la obtención del Título de
Médico Veterinario y Zootecnista

Autor:

Ramírez Balseca Danny Israel

Tutor:

Dr. Mg. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

Latacunga - Ecuador

Marzo 2018

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

“Yo **Danny Israel Ramírez Balseca** declaro ser autor (a) del presente Trabajo experimental: **EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN VACAS DONADORAS SUPEROVULADAS EN RELACIÓN A LA CALIDAD EMBRIONARIA**, siendo **Dr. Mg. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso**, tutor (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

.....
Ramírez Balseca Danny Israel

180363077-8

.....
Dr. Mg Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

0502236623

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte de **RAMIREZ BALSECA DANNY ISRAEL**, identificada/o con C.C. N°. **1804630778** de estado civil **SOLTERO** y con domicilio en Latacunga, a quien en lo sucesivo se denominará **LA/EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA/EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de **MEDICINA VETERINARIA**, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **TRABAJO EXPERIMENTAL** el cual se encuentra elaborado según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

Historial académico. – MARZO 2013- MARZO 2018

Aprobación HCA.

Tutor. - **Dr. Mg. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso**

Tema: “**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN VACAS DONADORAS SUPEROVULADAS EN RELACIÓN A LA CALIDAD EMBRIONARIA**”

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA/EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA/EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.

b) La publicación del trabajo de grado.

c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA/EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA/EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA/EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusulas cuartas, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga a los 02 días del mes de Marzo del 2018.

Sr. Danny Israel Ramírez Balseca

Ing. MBA. Cristian Tinajero Jiménez

EL CESIONADO

EL CESIONARIO

AVAL DEL TUTOR DE TRABAJO EXPERIMENTAL

En calidad de Tutor del Trabajo Experimental sobre el tema:

“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN VACAS DONADORAS SUPEROVULADAS EN RELACIÓN A LA CALIDAD EMBRIONARIA”, de **Ramírez Balseca Danny Israel** , de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que dicho Informe Investigativo cumple con los requerimientos metodológicos y aportes científico-técnicos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Validación de Titulación que el Honorable Consejo Académico de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Cotopaxi designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Latacunga, Marzo 2018

Tutor

Dr. Mg Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

0502236623

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprueban el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de

Cotopaxi, y por la Facultad de Ciencias Agropecuarias Y Recursos Naturales; por cuanto, el o los postulantes: Ramírez Balseca Danny Israel con el título de Trabajo experimental: **EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN VACAS DONADORAS SUPEROVULADAS EN RELACIÓN A LA CALIDAD EMBRIONARIA** han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de Sustentación de Trabajo experimental.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, Marzo 2018

Para constancia firman:

Lector 1 (Presidente)

Dr. Chicaiza Sánchez Luis Alonso

CC: 0501308316

Lector 2

MV. Edilberto Chacón Marcheco, PhD

CC: 1756985691

Lector 3

Dr. Pino Panchi Edwin Orlando

CC: 0502295983

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer a la UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI que me abrió las puertas para que me pueda formar académicamente.

A todos los docentes que de una u otra manera supieron sembrar conocimientos que me sirvan para desarrollarme profesionalmente.

Al Dr. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso quien es la persona que como docente, investigador, supo dirigir los caminos para que este trabajo experimental se pueda desarrollar de una forma exitosa, además de ser un motivador para no rendirme ante los obstáculos que se puedan presentar e inculcarme que en la vida profesional no hay que dejar de prepararse.

Al Dr. Eduardo Escribano Veloso persona que dedicó su tiempo, siendo su ayuda fundamental para poder realizar este trabajo experimental, una profesional que aporta mucho con la institución, en casos de investigación. Aparte de ser una persona que realizo su trabajo desinteresadamente.

A mi hermana Dra. Cristina Ramírez que cuando necesite de su ayuda supo brindármela para que pueda seguir adelante en mis metas.

A mi tía Carmen Balseca quien fue una de las impulsadoras y que me apoya moralmente para que me pueda desenvolver en mi profesión.

DEDICATORIA

A Dios por brindarme salud, rodearme de personas que ayudaron a lograr mis metas

darme las fuerzas para seguir adelante y no derrotarme en la adversidad.

A mi madre Rosa Balseca quien es la mujer que siempre estuvo ahí para apoyarme darme fuerzas y ayudarme a cumplir mis metas propuestas.

A mi padre Marco Ramírez quien me brindó su apoyo y que de una u otra manera me ayudo a conseguir mi objetivo final.

A mi prima Lilian López quien es como mi segunda mamá ya que ella me acompaño y supo llenar ese espacio cuando mi madre por motivos ajenos a su voluntad no pudo estar a mi lado.

Danny Israel Ramírez Balseca

RESUMEN

Entre los principales factores que determinan el éxito de un programa de ovulación múltiple y transferencia embrionaria (MOET), está la alta variabilidad en la respuesta superovulatoria vinculados a la raza, edad, tipo, altitud y dosis de FSH. El objetivo del

presente trabajo fue estudiar la relación de la concentración plasmática de progesterona respecto a la viabilidad y calidad embrionaria al día de la recolecta de embriones en la donadora. Se seleccionaron y superovularon con hormona foliculoestimulante (FSH-P) a dosis decrecientes, 7 hembras bovinas de la raza Holstein Friesian que van desde los 2 a 10 años de edad. La recolección embrionaria se efectuó 7 días después de la primera inseminación, así como la toma de muestras de sangre para determinar P4 mediante ELISA. Los datos se analizaron mediante la t Student. Se determinó que los niveles de progesterona plasmática en donadoras de embriones superovuladas al día 8 post inseminación van desde 1,67ng/ml, 2,05 y 67,32 ng/ml, además los estadios de desarrollo mórulas, Early blastocistos y blastocistos son correspondiente a los eventos progresivos de ovulación de la donadora. Los niveles de concentración de progesterona superiores a 20ng/ml establecieron un adecuado desarrollo embrionario y su mantención en grado 1 (excelente), a niveles inferiores a 15 ng/ml determinaron disminución en el desarrollo embrionario y degeneración. Se concluye que la viabilidad embrionaria (morfología – clasificación grado I, II y III) poseen una correlación positiva respecto a los niveles de progesterona plasmática en vacas donadoras superovuladas.

Palabras clave: Superovulación, progesterona, viabilidad embrionaria, estadios embrionarios.

ABSTRACT

Among the main factors that determine the success of a multiple ovulation program and embryo transfer (MOET) is the high variability in the superovulatory response linked to the race, age, type, altitude and dose of FSH. Thus, some studies show that

the plasma concentration of progesterone (P4) finds a relationship between embryonic production and P4 concentration, but others do not. The aim of the present work research was to study the relationship of plasma progesterone concentration with embryonic viability and quality to the day of embryo collection in the donor. They were selected and superovulation with follicle-stimulating hormone (FSH-P) at decreasing doses, 7 female bovine Holstein Friesian breed ranging from 2 to 10 years of age. The embryo collection was carried out 7 days after the first insemination, as well as taking blood samples to determine P4 by ELISA. The data was analyzed using the t Student test. It is determined that the levels of plasma progesterone in donors of superovulated embryos at day 8 post insemination range from 1.67ng / ml, 2.05 and 67.32 ng / ml, in addition the stages of development of morulas, Early blastocysts and blastocysts are corresponding to the progressive ovulation events of the donor; thus, levels of progesterone concentration higher than 20ng / ml established an adequate embryonic development and its maintenance in grade 1 (excellent), at lower levels than 15 ng / ml, determined a decrease in embryonic development and degeneration. It is concluded that embryonic viability (morphology - grade I, II and III classification) has a positive correlation with plasma progesterone levels in superovulated donor cows.

Key words: Superovulation, progesterone, embryonic viability, embryonic stages.

ÍNDICE DE PRELIMINARES

PORTADA..... i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....ii

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DEL TUTOR DE TRABAJO EXPERIMENTAL	v
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE PRELIMINARES.....	xi
INDICE DE CONTENIDO.....	xiii
INDICE DE TABLAS	xvi
INDICE DE ANEXOS.....	xviii

INDICE DE CONTENIDO

1.INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2.INTRODUCCIÓN	1

3.OBJETIVOS	2
3.1 General	2
3.2 Específicos.....	2
4.FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	2
4.1 ANATOMÍA REPRODUCTIVA	2
4.1.1 Ovario	2
4.1.2 Oviducto o Trompas de Falopio.....	2
4.1.3 Útero.....	3
4.1.4 Cérvix	3
4.1.5 Vagina	3
4.1.6 Vulva	3
4.2 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA	4
4.2.1 Hipotálamo	4
4.2.2 Hipófisis	4
4.3 FASES DEL CICLO ESTRAL.....	4
4.3.1 Estro, celo, calor (día 0)	5
4.3.2 Metaestro (día 1–4)	5
4.3.3 Diestro (día 5–17).....	5
4.3.4 Proestro (día 18–20).....	5
4.3.5 Folículos y oocitos.....	6
4.4 DINÁMICA FOLICULAR.....	6
4.4.1 Reclutamiento.....	6
4.4.2 Selección	6
4.4.3 Dominancia	6

4.5 VACAS DONADORAS	6
4.5.1 Selección de la donadora	7
4.5.2 Manejo de donadoras.....	7
4.6 SUPEROVULACIÓN.....	7
4.7 FACTORES QUE AFECTAN LA SUPEROVULACIÓN	7
4.7.1 Factores externos	7
4.7.2 Factores fisiológicos.....	8
4.8 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.....	8
4.8.1 Técnica de transferencia de embriones.....	8
4.8.1.1 Ventajas	8
4.8.1.2 Desventajas	8
4.9 MORTALIDAD EMBRIONARIA.....	9
4.9.1Causas de mortalidad embrionaria	9
4.9.1.1 Origen no-infeccioso.....	9
4.9.1.2 Origen infeccioso.....	9
4.10 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.....	9
4.10.1 Recolección quirúrgica.....	10
4.10.2 Recolección no quirúrgica transcervical	10
4.11 CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA	10
4.11.1 Evaluación Embrionaria	10
4.12 DESARROLLO EMBRIONARIO	10
4.12.1 Mórula compacta.-.....	10
4.12.2 Blastocisto temprano.-	10
4.12.3 Blastocisto.-	11

4.12.4 Blastocisto expandido.-	11
4.12.5 Blastocisto protruido	11
4.13 CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA	11
4.13.1 Grado 1 (Excelentes)	11
4.13.2 Grado 2 (Buenos)	11
4.13.3 Grado 3 (Regulares)	11
4.13.4 Grado 4 (Malos)	11
4.14 PROGESTERONA	11
4.15 PRUEBA DE ELISA	12
5.VALIDACIÓN DE LAS HIPÓTESIS.....	13
6.MATERIALES	13
6.1 Materiales de Pre-sincronización	13
6.2 Sincronización	13
6.3 Inseminación	13
6.4 Superovulación	14
6.5 Extracción de Embriones.....	14
6.7 Calificación, Visualización e Identificación de Embriones	15
6.8 Pruebas Hormonales	15
6.9 Transferencia de embriones.....	15
7.PROCEDIMIENTO/MÉTODO.....	16
7.1 Selección de donadoras	16
7.2 Selección de receptoras	16
7.3 Sincronización de donadoras y receptoras	16
7.4 Aplicación de FSH para superovulación en las donadoras	16

7.6 Extracción de embriones de las donadoras.....	17
7.8 Caracterización morfológica de los embriones obtenidos.....	17
7.9 Toma de muestras obtenidas de sangre, en donadoras	18
7.10 Análisis de progesterona	18
7.11 Análisis estadístico es la prueba t de Student para muestras emparentadas....	18
8.ANÁLISIS DE RESULTADOS	18
9.DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	25
10.CONCLUSIONES	27
11.RECOMENDACIONES	27
12.BIBLIOGRAFÍA	28
13.ANEXOS	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Procedimiento para la Superovulación	16
Tabla 2: Donadoras- Superovuladas/Número de embriones obtenidos /Grado y Estadios de desarrollo	19

Tabla 3: Respuesta superovulatoria /Promedio de niveles de Progesterona/estadios de desarrollo.....	21
Tabla 4: Niveles de Concentración de Progesterona plasmática vs. Embriones viables	22
Tabla 5: Niveles de Concentración de Progesterona Plasmática vs. Calidad Embrionaria /Grado I	23
Tabla 6: Niveles de Concentración de Progesterona Plasmática vs. Embriones Degenerados	23
Tabla 7: Edad de las Donadoras vs. Embriones Viables.....	24

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- AVAL DE TRADUCCION.....	32
Anexo 2.- Selección de donadoras.....	33
Anexo 3.- Sincronización de donadoras y aplicación de FSH para la superovulación.....	34
Anexo 4.- Inseminación artificial.....	35
Anexo 5.- Lavado de embriones	36
Anexo 6.- Visualización, calificación y valoración de los embriones obtenidos.....	37
Anexo 7.- Toma de muestras.....	39

1. INFORMACIÓN GENERAL

Tema:

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN VACAS DONADORAS SUPEROVULADAS EN RELACIÓN A LA CALIDAD EMBRIONARIA.

2. INTRODUCCIÓN

El sector ganadero ve en las nuevas tecnologías reproductivas el desarrollo de su establecimiento, entre ellas esta obtener embriones que puedan ser viables para una futura transferencia de líneas de animales genéticamente superiores, basándose en el avance de las técnicas de fertilización in vitro y en el cultivo de embriones.

La superovulación busca que el sector ganadero pueda beneficiarse de la misma haciendo que exista mayor número de ovulaciones mediante el cual se pueda obtener mayor cantidad de embriones que puedan ser transferidos aumentando así las probabilidades de preñez. El ciclo estral está regulado por una interacción hormonal regida por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero (Belacuba, 2007).

La progesterona es indispensable para el establecimiento y el mantenimiento de la preñez (Cutini, 2000).

Es una hormona que tiene como precursor al colesterol y se secreta por el cuerpo lúteo las principales características de esta hormona está en promover el crecimiento de las glándulas endometriales el desarrollo alveolar de las glándulas mamarias además de previene las concentraciones del útero a niveles excesivos.

La P4 constituye un factor indispensable en la iniciación y regulación de la gestación, ya que contribuye en el mantenimiento del cuerpo lúteo (Pitty, 2012).

Estudios realizados en donadoras con un porcentaje mayor > 3 ng/ml de progesterona muestran que las vacas tienen mayor promedio en el total de óvulos y embriones y en

los embriones transferibles que las que presentan menor cantidad de progesterona asociado a la funcionalidad o presencia del cuerpo lúteo (Ake, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluación de la viabilidad embrionaria mediante la valoración de los niveles de progesterona plasmática en vacas donadoras superovuladas en relación a la morfología embrionaria.

3.2 Específicos

- Determinar los niveles de progesterona plasmática en vacas donadoras de embriones superovuladas al día 8 post inseminación.
- Evaluar la viabilidad embrionaria mediante los diferentes grados de desarrollo embrionario en relación a su morfometría.
- Correlacionar los niveles de concentración de progesterona plasmática en relación a la viabilidad embrionaria.

4. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

4.1 ANATOMÍA REPRODUCTIVA

4.1.1 Ovario

Son los órganos encargados de producir las células reproductoras, conocidas como óvulos o huevos aunque su denominación correcta es ovocito. Normalmente el bovino sexualmente maduro expulsa uno o en ocasiones más óvulos cada 18 a 24 días, precedido del celo o calor. Además de producir óvulos, los ovarios producen hormonas que están relacionadas con el proceso de la reproducción y el crecimiento de la glándula mamaria (Yanguma, 2009).

4.1.2 Oviducto o Trompas de Falopio

Son dos tubos finos y flexuosos de 20 a 35 cm de largo, que comunica el útero con los ovarios. Es el lugar donde se realiza la fecundación (unión del óvulo con el

espermatozoide). Se divide en cuatro partes que son: Infundíbulo, Ámpula, Istmo y Unión útero tubarica (González, 2017).

4.1.3 Útero

Es el lugar donde se desarrolla el feto, posee un cuello, un cuerpo y dos cuernos. Generalmente se encuentra en la cavidad pélvica pero cuando hay preñez es más común en la cavidad abdominal (Gélvez, 2017).

4.1.4 Cérvix

Es la parte más caudal del útero, mide de 8 a 10 centímetros de largo, presenta una conformación cilíndrica y pliegues de la mucosa en dirección caudal, los cuales forman los llamados anillos del cérvix (generalmente 3 o 4). Las principales funciones del cérvix son las de servir como reservorio de semen, ayudar en el transporte del semen hacia el útero y servir como barrera entre el exterior y el útero (Cardona, 2013).

4.1.5 Vagina

La vagina es un tubo fibromuscular alargado que parte del borde del vestíbulo vulvar hacia adelante, de 10 a 20 cm de longitud, con paredes que presentan numerosos pliegues longitudinales y transversales; normalmente se encuentra colapsada y termina en un fondo de saco ciego alrededor del extremo posterior del cérvix o cuello uterino (Marquez, 2015).

4.1.6 Vulva

Forma el orificio sexual externo y se compone de dos labios. Inmediatamente por delante de la unión de los labios, en el piso vulvar, se encuentra el clítoris, que constituye un vestigio del pene. Se encuentran ubicados a los lados de la apertura vulvar como el labio derecho y izquierdo esta tiene como función: Dejar pasar la orina, Abrirse para permitir la copula y Servir como parte del canal del parto (González, 2017).

4.2 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA

El funcionamiento del aparato reproductor depende de una serie de sustancias producidas en el Sistema Nervioso Central del animal que viajan por vía sanguínea para producir su efecto sobre los ovarios y el útero y se denominan hormonas. Los ovarios, a su vez, en respuesta a estas hormonas, producen otras sustancias que actuarán sobre el útero, sobre otros tejidos y sobre el mismo Sistema Nervioso Central (Marquez, 2015).

El ciclo estral está regulado por una interacción hormonal regida por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero (Sintex, 2005).

4.2.1 Hipotálamo

Forma la base del cerebro, y sus neuronas producen la hormona liberadora de gonadotropina o GnRH. El GnRH, en la eminencia media, difunde a los capilares del sistema porta hipofisiario y de aquí a las células de la adenohipófisis en donde su función es estimular la síntesis y secreción de las hormonas hipofisiarias, FSH y LH (Sintex, 2005).

4.2.2 Hipófisis

Es una glándula endocrina que produce distintas hormonas que tienen importantes funciones en la regulación del metabolismo, el crecimiento y la reproducción. Es un órgano pequeño, de distinto tamaño y morfología según la especie animal. Se encuentra situado en una depresión central del cuerpo del hueso basiesfenoides, llamada fosa hipofisaria de la silla turca, separada de la masa encefálica por un pliegue de la duramadre, que se fusiona con el periostio del hueso (Antonio, 2009).

4.3 FASES DEL CICLO ESTRAL

El ciclo estral se puede dividir en tres fases:

- 1) Fase folicular o de regresión lútea (proestro)
- 2) Fase periovulatoria (estro y Metaestro)
- 3) Fase lútea (diestro).

El día 0 del ciclo estral es el día del celo, signo visible a simple vista, sin embargo desde el punto de vista fisiológico, la descripción se realizará a partir de la destrucción del cuerpo lúteo del ciclo anterior (Becaluba, 2007).

4.3.1 Estro, celo, calor (día 0)

Es la etapa caracterizada por un periodo de receptividad sexual en donde la hembra acepta la monta y el apareamiento. Se le considera el inicio del CE (día 0), corresponde al primer día del estro cuya duración es de 15 h promedio con un rango de 06-24 h aproximadamente, variando según la edad, la raza y estado nutricional; en esta etapa se da el pico de la hormona luteinizante (LH) 2-6 horas (Jiménez, 2016).

4.3.2 Metaestro (día 1–4)

La ovulación en la vaca es un fenómeno espontáneo que tiene lugar unas 12 horas después de finalizado el estro. Las células granulosas del folículo que ha ovulado se transforman en células luteales, a partir de las cuales se forma el cuerpo lúteo. En esta fase se reducen las secreciones de las glándulas uterinas, cervicales y vaginales. Los síntomas de celo comienzan a desaparecer; en algunos animales se puede ver un mucus sanguinolento (Lopez, 2017).

4.3.3 Diestro (día 5–17)

El cuerpo lúteo completa su desarrollo y el útero se prepara para recibir al embrión, en caso de no presentar preñez se repite el ciclo (Gélvez, 2016).

4.3.4 Proestro (día 18–20)

Tiene una duración promedio de 3 días.

Externamente se manifiesta por inquietud del animal, aunque aún no acepta ser montada.

Internamente se presenta crecimiento del folículo y maduración del óvulo. Está influido por los estrógenos (Gaona, 2015).

4.3.5 Folículos y oocitos

Los ovarios de una hembra bovina al nacer tienen aproximadamente 200 mil oocitos primarios que teóricamente al ser fertilizados pueden dar origen a un ser.

Sin embargo, sólo un oocito es eliminado desde un folículo cada 21 días. Los ovarios contienen 1.000 veces más oocitos que los que maduran y ovulan durante la vida productiva de un animal (Campo, 2010).

4.4 DINÁMICA FOLICULAR

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio. Entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular ocurren durante un ciclo estral bovino, y el folículo preovulatorio deriva de la última (Becaluba, 2007).

4.4.1 Reclutamiento

El reclutamiento es un proceso por el que, bajo la responsabilidad de la FSH, un conjunto de folículos antrales tempranos (2-3 mm de diámetro) comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrófico que les permita progresar a la ovulación (Albeitar, 2003).

4.4.2 Selección

Durante los días 2, 3 y 4 del ciclo estral, uno o varios folículos (provenientes de la etapa de reclutamiento) con un tamaño promedio de 6 a 9 mm, se relaciona con la interferencia del folículo más grande sobre la capacidad de los folículos más pequeños de recibir un adecuado soporte gonadotrófico (Tovio, 2013).

4.4.3 Dominancia

Es la etapa de desarrollo folicular que comprende desde la divergencia hasta el momento en que el folículo dominante produce la máxima cantidad de estradiol, antes de desarrollar atresia u ovular (Ramírez, 2013).

4.5 VACAS DONADORAS

Hay dos tipos de vaca que se necesitan para desarrollar el trabajo de transferencia de embriones. Por un lado están las donantes, que son vacas élite y que son las dadoras de

genética. El proceso de selección de donantes es uno de los procesos más importantes (Gutiérrez, 2014).

4.5.1 Selección de la donadora

La selección de las donadoras está regida por criterios de productividad, mejoramiento genético y valor agregado de las crías, ya que sus costos tienden a reducirse en la medida que aumentan estos aspectos (Rivera, 2006).

4.5.2 Manejo de donadoras

El manejo de la donante debe comenzar bastante antes de entrar en el programa y en esta etapa se deberá cumplir con el propietario para que comprenda y aprecie cómo debe ser manejada la vaca y cuál es su responsabilidad en ello. Muchas vacas ciclarán en forma irregular en los dos primeros meses posparto si están bien nutridas y luego comenzarán a ciclar más regularmente. Otras no ciclarán mientras tengan su ternero al pie aun estando bien nutridas (Albeiro, 2008).

4.6 SUPEROVULACIÓN

Es la inducción de ovulaciones múltiples mediante el uso de gonadotropinas exógenas. Esta técnica es empleada en el procedimiento de producción y colecta de embriones y sin ella sería imposible llevar a cabo esta práctica de mejoramiento genético (Serrano, 2009).

La superovulación de la vaca permite que ésta, en vez de ovular una sola vez y producir un embrión por año, con la estimulación produzca mayor cantidad de óvulos, que puede así llegar a los 10 o 12. Posteriormente, se insemina a las vacas, y 7 a 8 días después (Frutos, 2010).

4.7 FACTORES QUE AFECTAN LA SUPEROVULACIÓN

5.7.1 Factores externos

Factores tales como periodo del año o la estación, la nutrición y el manejo, y el semen pueden afectar la respuesta superovulatoria de una manera directa o indirecta (Jimenez, 2009).

4.7.2 Factores fisiológicos

Se ha propuesto que la especie, la raza, la edad, el número de partos, el estado lactacional, la fertilidad de la vaca, el estatus sanitario (Claudia, 2009).

4.8 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La transferencia de embriones es una técnica para el mejoramiento genético del ganado que actualmente está siendo muy difundida en nuestro país, debido a los buenos resultados obtenidos. En condiciones normales, cada vaca produce una sola cría al año, lo cual significa que cuando mucho producirá de 6 a 8 terneros en su vida. Con la transferencia de embriones, se ha llegado a obtener más de cien crías de una vaca durante su vida productiva (Frutos, 2010).

4.8.1 Técnica de transferencia de embriones

La técnica de transferencia de embriones consiste en recolectar del útero de la hembra donadora el o los embriones, clasificarlos, empacarlos y congelarlos o pasarlos en fresco al útero de una o más hembras receptoras que servirán de incubadoras exclusivamente de ese embrión y que se encuentre con los mismos días del ciclo sexual que la donadora (Perez, 2011).

4.8.1.1 Ventajas

- Prolongación de la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos.
- Creación de bancos de gametos provenientes de animales seleccionados por excelencia productiva y/o adaptabilidad.
- Determinación y selección del sexo de embriones.
- Control de enfermedades de la esfera reproductiva (Pelaez, 2011).

4.8.1.2 Desventajas

- Requiere de técnicas avanzadas y complejas.
- Requiere investigación en las áreas de: alimentación, reproducción, etc.

- Mayor costo comparado a la in-seminación artificial; no obstante el beneficio económico es mayor (INIA, 2017).

4.9 MORTALIDAD EMBRIONARIA

La mortalidad embrionaria es considerada la principal causa responsable por el aumento en el intervalo entre partos en los bovinos. La mayoría de las muertes embrionarias ocurre durante el periodo embrionario de la gestación (< 45 d) tanto en bovinos de carne como de leche (Sartori)

4.9.1 Causas de mortalidad embrionaria

4.9.1.1 Origen no-infeccioso

Existe un nivel basal de mortalidad embrionaria que en general está asociado a defectos cromosomales heredados o adquiridos. Defectos heredados como las translocaciones genéticas han sido detectados y se han logrado eliminar casi totalmente de las poblaciones. Sin embargo la expresión de genes letales debido a la consanguinidad se está incrementando en algunas razas y se estima que la ME puede incrementar entre un 2-10% por esta razón (Claudia, 2009)

4.9.1.2 Origen infeccioso

Infecciones específicas del aparato genital, tales como brucelosis, tricomoniasis, vibriosis, tuberculosis, leptospirosis, Mycoplasmosis, rinotraqueitis bovina infecciosa (I.B.R.), vaginitis pustular infecciosa (I.P.V.), etc. Pueden interferir sobre la gestación destruyendo el huevo fecundado y el embrión en desarrollo. Constituyen un factor preponderante en las causas de mortalidad embrionaria (Bavera, 2000).

4.10 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Existen tres métodos de colección de embriones, dos quirúrgicos y uno no quirúrgico, el primero requiere de médicos, anestesistas y cirujanos, lo cual hace de esta técnica algo impráctico quedando en desuso. El segundo método consiste en una laparotomía por uno de los flancos usando anestesia regional y local. El tercer método es el no quirúrgico o transcervical, que actualmente es el más usado (Salazar, 2006).

4.10.1 Recolección quirúrgica

A través de la línea media con el animal bajo anestesia general, el cual es impracticable en terreno (Campo).

Por medio de una incisión de 15 cm de longitud en la línea media, por delante de la glándula mamaria, se extraían los cuernos uterinos con los ovarios. El lavaje de los cuernos y oviductos se llevaba a cabo el día 5-7 introduciendo catéteres de goma a través de la pared dorsal del cuerno uterino y en la ampolla del oviducto. Cada cuerno era lavado con volúmenes variables de 40-60 ml de una solución buffer (Palma, 2001).

4.10.2 Recolección no quirúrgica transcervical

Se lleva a cabo igual que la inseminación artificial, bajo palpación rectal por las vías naturales a través de la vagina, cérvix, cuerpo de la matriz hasta el cuerno uterino ipsilateral. Para ello se coloca el embrión ya localizado en la pajuela (0.25 mi) en el catéter de transferencia cuya apertura se encuentra situada lateralmente en el extremo final del mismo (Ochoa, 2005).

4.11 CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA

4.11.1 Evaluación Embrionaria

Los embriones se clasifican de acuerdo con dos criterios: grado de desarrollo y calidad. La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), han designado un número progresivo para 10s diferentes estadios de desarrollo y para la calidad del embrión (Rodríguez, 2006).

4.12 DESARROLLO EMBRIONARIO

4.12.1 Mórula compacta.- Sus blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa sólo el 60-70% del espacio perivitelino.

4.12.2 Blastocisto temprano.- Se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación de una cavidad (blastocelo) en el interior del embrión, ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna.

4.12.3 Blastocisto.- Existe una marcada diferenciación entre las células del trofoblasto, que constituyen una pared -que se adosa a la zona pelúcida y la masa celular interna (o disco embrionario) más oscura.

4.12.4 Blastocisto expandido.- La presión creciente del blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida. Los embriones recuperados en este estadio se pueden colapsar temporalmente, esto se caracteriza por una pérdida completa o parcial del blastocele.

4.12.5 Blastocisto protruido.- Los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocele bien definido ("burbuja") o colapsado (Palma, 2001).

4.13 CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA

4.13.1 Grado 1 (Excelentes): Muestran contornos celulares bien definidos y no hay dispersión ni destrucción en los blastómeros.

4.13.2 Grado 2 (Buenos): Embriones con algunos cambios tales como granulaciones atípicas, algunas con signos de degeneración y opacidades anormales.

4.13.3 Grado 3 (Regulares): Embriones que presentan blastómeros dispersos (poca cohesión) y mayor grado de degeneración ocasionalmente blastómeros asimétricos pero parte de la masa celular se mantiene viable.

4.13.4 Grado 4 (Malos): Alto grado de degeneración que imposibilita determinar el grado de desarrollo (Izquierdo, 2015).

4.14 PROGESTERONA

La progesterona, hormona esteroidea, es producida por el cuerpo lúteo por acción de la LH. Los efectos de la progesterona se observan después que el tejido blanco ha estado expuesto durante cierto tiempo a la estimulación de los estrógenos. Esta preparación por los estrógenos conduce a un efecto sinérgico. La progesterona prepara el útero para el implante del embrión y para mantener la gestación (Becaluba, 2007).

La Progesterona prepara al útero para la gestación, La progesterona también evita que el animal vuelva al celo al inhibir la liberación de gonadotropinas de la glándula Pituitaria en el cerebro (Nebel, 2011).

Se pueden encontrar valores altos de esta hormona alrededor del día 10 después de la ovulación y estos valores se mantienen, y no decaen como en el animal no gestante, alrededor del día 16 o 17 del ciclo (Matamoros, 2002).

En el metaestro los niveles de estrógenos y progesterona (P4) son bajos y en el bovino se da la ovulación en este período y ocurre una secreción de sangre que se extiende por la cola que por lo general se tiende a confundir como una señal de concepción o de falla, dura entre 2-4 días. El diestro se caracteriza como el periodo donde el cuerpo lúteo es funcional, comienza desde el día 5 aumentando su concentración de progesterona (P4) en la sangre y termina con la regresión del cuerpo lúteo al día 16; seguidamente comienza el proestro que presenta una caída de los niveles de P4, y finalizando con el inicio del estro en el día 21 (Stevenson, 2012).

4.15 PRUEBA DE ELISA

La medición de P4 en suero o plasma está considerado es una de las formas que tiene más relevancia para conocer los niveles del mismo.

Se basa en el enlace competitivo entre la progesterona, eventualmente presente en la muestra analizada, y una cantidad fija de progesterona marcado con el enzima fosfatasa alcalina (AP), hacia los lugares de enlace del anticuerpo específico anti-progesterona adherido a los pocillos. Los pocillos de la placa de hecho han sido tapizados con el anticuerpo específico anti-progesterona y representan la fase sólida del enlace entre la progesterona y el anticuerpo (Agrolabo, 2011).

Después de la primera incubación, se hace un primer lavado para eliminar todos los componentes no unidos de manera específica a los lugares de enlace del anticuerpo. La cantidad de progesterona marcada con fosfatasa alcalina que se ha unido al pocillo es inversamente proporcional a la concentración de progesterona presentes en la muestra analizada (Agrolabo, 2011).

La cantidad de progesterona marcada puede ser determinada añadiendo durante la segunda incubación el sustrato/cromógeno (p-nitrofenilfosfato) que en presencia del enzima fosfatasa alcalina determina una reacción colorimétrica (Agrolabo, 2011).

El color que aparece se mide con un lector de placas, midiendo la densidad óptica de cada pocillo a una longitud de onda de 405 nm. La cantidad de progesterona se extrapola de la curva obtenida con los valores de absorbencia de los estándares (Agrolabo, 2011).

5. VALIDACIÓN DE LAS HIPÓTESIS

H₁= La progesterona influye en la calidad embrionaria (mórula y blastocitos) en relación a los grados I, II, III.

H₀= La progesterona no influye en la calidad embrionaria (mórula y blastocitos) en relación a los grados I, II, III.

6. MATERIALES

6.1 Materiales de Pre-sincronización

Hormonales

- GnRH
- Jeringas
- Guantes
- Agujas

6.2 Sincronización

- Prostaglandina
- Jeringas
- Guantes
- Agujas

6.3 Inseminación

- Pistola de inseminación
- Catéter de inseminación
- Pajuelas
- GnRH
- Guantes
- Chemise
- Termo
- Cronometro
- Corta pajuelas

6.4 Superovulación

- Implante CIDER
- Folltropin®
- Estrumate®
- GnRH
- Guantes
- Jeringas
- Agujas

6.5 Extracción de Embriones

- Vigro Complete Flush
- Vigro Holding Plus
- Emcom Filter

- Sonda de extracción
- Soporte universal
- Pinzas
- Guantes ginecológicos
- Gel
- Jeringas
- Agujas
- Latex Catheters 16 o 18

6.7 Calificación, Visualización e Identificación de Embriones

- Well dish with lid
- Jeringa de embolo plástico
- Estéreo microscopio
- Microscopio invertido micromanipulador
- Micropipeta 0,4 y 0,10 microlitro

6.8 Pruebas Hormonales

- ELISA

6.9 Transferencia de embriones

- Pistola de transferencia
- Catéteres
- Chemise
- Gel
- Guantes

7. PROCEDIMIENTO/MÉTODO

7.1 Selección de donadoras

Se seleccionaron 7 donadoras de acuerdo a sus características genéticas, capacidad productiva, que las mismas no presentes problemas ginecológicos y que su vida reproductiva haya sido regular.

7.2 Selección de receptoras

Se seleccionaron vacas receptoras, según el criterio de (Ochoa, 2005) de que toda vaca con un punto de vista sexual y sin patologías reproductivas además de animales con una vida sana y sin trastornos ginecológicos se la puede tomar como animales receptores en este punto de vista el aspecto genético no tiene mucha importancia aunque exista influencia en los embriones y desarrollo.

7.3 Sincronización de donadoras y receptoras

Se confeccionó previamente un plan de sincronización, basándose que no exista una variación mayor a los 3 días al igual que los celos no deberán presentar una variación mayor a los 7 días.

7.4 Aplicación de FSH para superovulación en las donadoras

Sirvió para la estimulación hormonal, la formación y desarrollo de varios folículos y su ovulación en un momento previamente fijado, se la realizara mediante la inyección de hormonas gonadotropinas.

Tabla 1: Procedimiento para la Superovulación

DONADORA		
DIA	6:00 AM	6:00pm
1		2,5 FOLLTROPIN
2	2,5 FOLLTROPIN	2 FOLLTROPIN
3	2 FOLLTROPIN	1,5 FOLLTROPIN

4	1,5FOLLTROPIN + 2 cc ESTRUMATE	1 FOLLTROPIN + 2cc ESTRUMATE+SACAR IMPLANTE
5	1 FOLLTROPIN	0,5 FOOLTROPIN
6	0,5 FOLLTROPIN	
CELO DONADORA	DIA 6 (MADRUGADA) 12 HORAS DE INICIADO EL CELO 3 cc GESTAR	
EXTRACCION EMBRIONES 7mo día post inseminación artificial		

7.5 Inseminación de artificial de las donadoras

Después de presentado los celos se procedió a inseminar a las 12 horas posteriores, debido a que las superovulaciones están con diferente intervalo de tiempo lo más recomendable se lo realizó 2 o 3 inseminaciones cada 12 horas.

7.6 Extracción de embriones de las donadoras

La extracción de embriones se realizó preferentemente 7 días después de la inseminación mediante un lavado uterino transcervical esta fecha es lo más recomendable ya que los embriones se ubican al extremo anterior del cuerpo uterino y en ese momento los embriones se encuentra en estado de mórulas y blastocisto fases que son muy estables.

7.7 Visualización, calificación y valoración de los embriones obtenidos

Una vez obtenidos los embriones estos fueron visualizados calificados y valorados para ver cuántos de los mismos son viables para que puedan ser transferidos.

7.8 Caracterización morfológica de los embriones obtenidos

La caracterización se la realizó de acuerdo al tipo de desarrollo embrionario al igual de los grados que serán basados de acuerdo a la sociedad internacional de transferencia de embriones.

7.9 Toma de muestras obtenidas de sangre, en donadoras

Las muestras fueron obtenidas de las venas de los animales (Caudal), 10ml que se envió al respectivo laboratorio para que sean analizadas.

7.10 Análisis de progesterona

Se las realizó mediante el test de ELISA

7.11 Análisis estadístico es la prueba t de Student para muestras emparentadas

Después de recibidos los resultados se realizó mediante esta prueba y pudiendo comprobar las variables que se compararon.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El número de donadoras (vacas y vaconas) que fueron sometidas a un protocolo de superovulación mediante la aplicación de hormona FSH – Folltropin (extracto purificado de pituitaria de cerdo) en dosis decreciente (Tabla 1), valoración de la concentración plasmática de progesterona, la edad que va desde los dos años hasta los diez años. Así como la respuesta superovulatoria, el número de embriones viables obtenidos, sus estadios de desarrollo (mórulas, Early blastocistos, y blastocistos), la calidad embrionaria expresada en grado I, II, degenerados y óvulos no fertilizados/UFOS.

Tabla 2: Donadoras- Superovuladas/Número de embriones obtenidos /Grado y Estadios de desarrollo

	Concentración plasmática de progesterona	Categoría	Edad/años	Edad Donadoras	Total Recuperados	Embriones Viables	Estadio De Desarrollo	Morulas	Early Blastocistos	Blastocistos	Grado 1	Grado 2	Degenerados	Ufos Ovulos No Fecundados
Identificación	ng/mL													
<i>CHARITO 1</i>	1,67	Vaca	10 años 2 meses	10	12	0							7	5
<i>DOMENICA</i>	3,16	Vacona	22 meses	2	5	4	1 Blastocisto - 3 Early Blastocistos		3	1	1	0	0	0
<i>CRISTINA</i>	2,05	Vaca	4 años 3 meses	4	1	1	1 Morula Compacta	1		0	1	0	0	0
<i>MILK</i>	9,23	Vacona	26 meses	2	9	7	7 Early Blastocistos		7	0	1	0	1	1
<i>CHARITO 2</i>	8,98	Vaca	10 años 2 meses	10	10	6	1 Blastocisto - 5 Morulas Compactas	5		1	5	0	3	1
<i>CHARITO 3</i>	67,32	Vaca	10 años 2 meses	10	6	6	4 Morulas - 2 Blastocistos	4		2	1	0	0	0
<i>GISELLA</i>	43,59	Vaca	8 años 2 meses	8	8	5	3 Morulas - 2 Blastocistos	3		2	5	0	3	0
Promedio	136			46	51	29		13	10	6	14	0	14	7
Promedio	19,43			6,57	7,29	4,14		3,25	5	1,5	2,33	0	3,5	2,33

Respecto al porcentaje de superovulación y número de embriones por vaca y vaconas, se observa que no se obtuvo diferencias estadísticas significativas (Tabla N.-3), sin embargo, se evidencia correlaciones y diferencias entre las medias. Así, la respuesta superovulatoria determinó diferencias numéricas entre las vacas y vaconas; sin embargo, el porcentaje de superovulación obtenido con Folltropin® fue del 100%.

Se presenta el porcentaje de respuesta superovulatoria en relación al número de donadoras aplicadas Folltropin (vacas y vaconas) , el promedio de concentración de progesterona, el número de embriones viables, el porcentaje de embriones obtenidos en los diferentes estadios de desarrollo (mórulas, Early blastocistos, blastocistos) y embriones degenerados.

Tabla 3: Respuesta superovulatoria /Promedio de niveles de Progesterona/estadios de desarrollo

Respuesta Superovulación	7	100%
Promedio Progesterona ng/ml	19,42	
Vacas	5	
Vaconas	2	
Embriones Viables	29	
Promedio de embriones viables	4,14	
Embriones Mórulas	3,25	44,82%
Early Blastocitos	5	34,48%
Blastocitos	1,5	20,68%
Embriones degenerados	14	

No existe diferencia estadística significativa, entre la concentración de la progesterona plasmática en relación a los embriones viables, ya que el p-valor (0,169) es mayor que el nivel de significancia (0,05). Sin embargo, se observa que los niveles de Progesterona se mantienen en el rango promedio respecto a niveles de concentración en vacas gestantes, y la

media internacional de embriones viables está dentro de lo estimado por la IETS/ Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

Tabla 4: Niveles de Concentración de Progesterona plasmática vs. Embriones viables

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Niveles de Progesterona	Embriones viables
Media	19,42	4,14
Varianza	662,09	7,14
Observaciones	7	7
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	1,563	
P(T<=t) una cola	0,084	
Valor crítico de t (una cola)	1,943	
P(T<=t) dos colas	0,169	
Valor crítico de t (dos colas)	2,446	

No existe diferencia estadística significativa, entre los niveles de concentración de progesterona con la calidad embrionaria (grado1) ya que el p-valor (0,130) es mayor que el nivel de significancia (0,05). Sin embargo, se observa que los niveles de Progesterona se mantienen en el rango promedio respecto a niveles de concentración en vacas gestantes, y la media internacional de embriones viables grado I es variable según lo estimado por la IETS/ Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

Tabla 5: Niveles de Concentración de Progesterona Plasmática vs. Calidad Embrionaria /Grado I

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Niveles de Concentración de Progesterona Plasmática	Calidad Embrionaria /Grado I
Media	19,428	2,333
Varianza	662,099	4,266
Observaciones	7	6
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	1,751	
P(T<=t) una cola	0,065	
Valor crítico de t (una cola)	1,943	
P(T<=t) dos colas	0,130	
Valor crítico de t (dos colas)	2,446	

No existe diferencia estadística significativa, de los niveles de progesterona con la cantidad de embriones degenerados obtenidos, ya que el p-valor (0,124) es mayor que el nivel de significancia (0,05). Sin embargo, se observa que los niveles de Progesterona se mantienen en el rango promedio respecto a niveles de concentración en vacas gestantes, y la media internacional de embriones degenerados es considerable según lo estimado por la IETS/ Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

Tabla 6: Niveles de Concentración de Progesterona Plasmática vs. Embriones Degenerados

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	Progesterona	Embriones Degenerados
Media	19,428	2
Varianza	662,099	6,666
Observaciones	7	7
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	1,783	
P(T<=t) una cola	0,062	
Valor crítico de t (una cola)	1,943	
P(T<=t) dos colas	0,124	
Valor crítico de t (dos colas)	2,446	

No existe diferencia estadística significativa entre la edad de las donadoras en relación a los embriones viables, ya que el p-valor (0,1925) es mayor que el nivel de significancia (0,05). Sin embargo, se observa que existe una relación entre las medias respecto al edad de las donadoras Vs los embriones viables, determinado que a medida que aumenta la edad el número de embriones viables disminuye y a medida que disminuye la edad en las donadoras el número de embriones viables aumentan.

Tabla 7: Edad de las Donadoras vs. Embriones Viables

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Edad de las Donadoras	Embriones Viables.

Media	6,571	4,142
Varianza	14,285	7,142
Observaciones	7	7
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	1,388	
P(T<=t) una cola	0,0962	
Valor crítico de t (una cola)	1,795	
P(T<=t) dos colas	0,192	
Valor crítico de t (dos colas)	2,200	

9. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El porcentaje de superovulación y número de embriones por vaca y vaconas, obtenido en la investigación, resultó similar a los encontrados por Mejía y Vásquez (2012) quienes obtuvieron una respuesta superovulatoria del 100% utilizando Folltropin®.

Por otra parte no se encontró diferencias significativas en el número de embriones producidos por vaca y vacona 4,14% (Cuadro 2); estos resultados son inferiores a los encontrados por Mejía y Vásquez (2012) quienes obtuvieron 5.6 embriones promedio recolectados por vaca utilizando Folltropin®.

Respecto a la calidad embrionaria las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los niveles de concentración de progesterona plasmática versus número y porcentaje de embriones producidos de acuerdo al grado I, se observaron diferencias numéricas y porcentuales entre vacas y vaconas (Cuadro 2), obteniendo de 29 embriones viables un promedio de 4,14 que es equivalente al 92 %, y de estos grado I 14 embriones que representa el 48,27%; no se obtuvo embriones grado II, sin embargo los embriones degenerados también fueron 14 y estos representan el 48,27% de . Estos resultados superan los de Kelly et

al. (2017) quienes reportaron el 45.08% de sus embriones en grado I y II utilizando Folltropin® sin embargo son inferiores al 67.44% de los embriones en grado I y II, similares a los datos obtenidos por Mejía y Vásquez (2012) quienes obtuvieron 64.7% de embriones grado I y II.

En relación a la clasificación de los embriones con base al estadio de desarrollo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los niveles de concentración de progesterona plasmática versus los estadios de desarrollo Mórula, Early blastocistos y blastocistos, sin embargo se presentan diferencias numéricas y porcentuales obteniendo 13 Mórulas (44,82 %), 10 Early blastocistos (34,48 %) y 6 blastocistos (20,68 %). Según Curtis (2014), los embriones buenos para fines de TE comercial normalmente son los embriones en estadio de Mórula (M), Blastocisto Temprano (Bt), Blastocisto expandido (Be) y preferiblemente Blastocisto (B).

Respecto a la edad de las donantes de embriones versus el número de embriones viables no existe diferencia estadística significativa, sin embargo existe diferencia numérica entre las medias, por tanto la edad y la caracterización de la donante sea esta vaca o cavona podrían influir directamente en la calidad de los embriones, siendo el mayor número de embriones viables y de mejor calidad (grado I) los embriones obtenidos en las vaconas. Esto se debe a que en las vacas el ciclo de vida celular cronológico ovárico y folicular determina envejecimiento en el tejido ovárico y por lo tanto en la calidad del ovulo de las vacas; otro factor que podría estar influenciado en la calidad y mantención del desarrollo embrionario son los niveles de progesterona. Así, en el presente estudio encontramos un porcentaje paralelo de embriones degenerados respecto a los embriones viables, por tanto, los niveles de progesterona podrían estar influenciados directamente respecto al ambiente uterino y la mantención optima en el desarrollo y progresión de los embriones. Se sugiere que los niveles plasmáticos para mantener y nutrir un embrión en vacas en altitud elevada va de 8,98 ng/ml a 67,32 ng/ml y en vaconas van desde 3,16 ng/ml a 9,23 ng/ml en los siete primeros días post inseminación en donadoras superovuladas que mantienen embriones en el lumen uterino., sin embargo se estimaría que estos niveles deberían ser superiores cuando un animal esta superovulado y el útero de la donante debe mantener más de un embrión; por tanto se podría

sugerir que la aplicación de progesterona exógena post inseminación artificial de la donante o un implante intravaginal hasta el momento de la extracción de los embriones mejoraría considerablemente mantención y calidad de los embriones.

10. CONCLUSIONES

Se concluye que la viabilidad embrionaria (morfología – clasificación grado I, II y III) poseen una correlación positiva respecto a los niveles de progesterona plasmática en vacas donadoras superovuladas.

- Los niveles de progesterona plasmática en donadoras de embriones superovuladas al día 8 post inseminación, se determinó que los niveles inferiores que van desde 1,67ng/ml se relacionan con la obtención de óvulos no fecundados (óvulos); niveles de 2,05 ng/ml con 1 embrión) y 67,32 ng/ml con la obtención de 6 embriones.
- De los embriones obtenidos el desarrollo embrionario (estadios) mórulas, Early blastocistos y blastocistos, es correspondiente a los eventos progresivos de ovulación de la donadora.
- Respecto a viabilidad embrionaria los niveles de concentración de progesterona superiores a 20ng/ml establecieron un adecuado desarrollo embrionario y su mantención en grado 1 (excelente), así niveles inferiores a 15 ng/ml determinarían disminución en el desarrollo embrionario y degeneración.

11. RECOMENDACIONES

- Por la correlación que existe entre los niveles de concentración progesterona plasmática y la viabilidad y calidad embrionaria se recomendaría la aplicación de progesterona exógena post inseminación artificial de las donadoras superovuladas.
- La progesterona exógena en hembras bovinas superovuladas se podría aplicar en el día 4 post inseminación artificial; sin embargo se recomendaría hacer estudios para determinar el día más adecuado de aplicación de P4.
- Evaluar los efectos de la progesterona exógena en vacas superovuladas aplicadas post inseminación y su efecto en el desarrollo del cuerpo lúteo en fase de Metaestro.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Agrolabo. (Abril de 2011). *Agrolabo S.p.A.* Recuperado de <http://www.agrolabo.it/ES/index.php?page=prodotto&menu=21&ID=68&opt=1&om=>
- Ake, J. R. (Enero de 2009). Concentración plasmática de progesterona y producción embrionaria, en vacas superovuladas bajo condiciones tropicales. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/26497719>
- Albeiro. (2008). MANEJO DE DONANTES Y RECEPTORAS. Recuperado de www.reprobiotec.com
- Albeitar. (Enero de 2003). Ondas foliculares en bovinos. Su importancia en la sincronización de celos. *portalveterinaria.com*. Recuperado de <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3351/articulos-rumiantes-archivo/ondas-foliculares-en-bovinos.-su-importancia-en-la-sincronización-de-celos.html>
- Antonio, S. (2009). Sistema endocrino. Generalidades. Hipófisis. Generalidades y estructura general. Adenohipófisis: estructura y ultraestructura. Neurohipófisis. Epífisis: generalidades y estructura. *Universidad De Murcia*. Recuperado de <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologia-e-histologia-veterinaria/material-de-clase-1/tema29-endocrino-i.pdf>
- Bavera. (2000). MORTALIDAD EMBRIONARIA. *Sitio Argentino Produccion Animal*. Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria/19-mortalidad_embriionaria.pdf
- Becaluba, F. (2007). FACTORES QUE AFECTAN LA SUPEROVULACIÓN EN BOVINO. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf
- Campo, M. R. (2010). Transferencia de embriones en bovinos: métodos y técnicas. *Monografías De Veterinaria*. Recuperado de https://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_simple/0,1420,SCID%253D7981%2526ISID%253D419%2526PRT%253D7958,00.html
- Cardona, J. C. (21 de Febrero de 2013). ANATOMIA Y FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA BOVINA. Recuperado de <http://reproduccion2-2013.blogspot.com/2013/02/anatomia-y-fisiologia-reproductiva-de.html>

- Claudia, J. (2009). Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en Bovinos. Recuperado de <http://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/viewFile/13769/14746>
- Cutini. (2000). FACTORES QUE DETERMINAN EL RESULTADO DE LA TRANSFERENCIA NO QUIRURGICA DE EMBRIONES BOVINOS. Recuperado de <http://vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/ObstetriciaInseminacionArtificial/images/Documentos/Embrionaria.pdf>
- Frutos, J. (24 de Noviembre de 2010). Transferencia de embriones en bovinos. *ABC Color*. Recuperado de <http://www.abc.com.py/articulos/transferencia-de-embriones-en-bovinos-188707.html>
- Gaona, M. G. (2015). CICLOS REPRODUCTIVOS. *Blogspot.com*. Recuperado de <http://reproduccionbovina-mgrg.blogspot.com/p/ciclos-reproductivos.html>
- Gélvez, L. D. (2016). Ciclo estral y celo en vacas. *Mundo Pecuario*. Recuperado de http://mundo-pecuario.com/tema252/reproduccion_bovinos/ciclo_estral_bovinos-1497.html
- Gélvez, L. D. (2017). El útero o matriz de los animales. *Mundo Pecuario*. Recuperado de http://mundo-pecuario.com/tema166/anatomia_reproductiva/utero-814.html
- González, K. (17 de Junio de 2017). Anatomía reproductiva de la vaca. Recuperado de <http://zoovetespasion.com/ganaderia/reproduccion-bovina/anatomia-reproductiva-de-la-vaca/>
- Gutiérrez, N. (27 de Octubre de 2014). Transferencia de Embriones: Vacas donadoras y receptoras. *jalisco.com.mx*. Recuperado de <http://seder.jalisco.gob.mx/fomento-ganadero-e-inocuidad/611>
- INIA. (2017). LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES. *inia.gob.pe*. Recuperado de <http://www.inia.gob.pe/tecnologias/crianzas/131-cat-tecnologias/crianza/389-la-transferencia-de-embriones>
- Izquierdo, A. C. (2015). CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS. *revistas.ucm.es*. Recuperado de <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/51041/47391>
- Jimenez. (2009). Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en Bovinas. *revistas.unal.edu.com*. Recuperado de <http://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/viewFile/13769/14746>

- Jiménez, A. (17 de Enero de 2016). *BMeditores*. Recuperado de <http://bmeditores.mx/ciclo-estral-bovino-fases-etapas/>
- Lopez, J. (2017). Ciclo estral en la vaca. *R.Vet.* Recuperado de <http://www.reproduccionveterinaria.com/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/fisiologia-obstetrica2/ciclo-estral/ciclo-estral-en-la-vaca/>
- Marquez, J. G. (30 de Marzo de 2015). Generalidades de la Ganaderia Bovina. Recuperado de <http://generalidadesdelaganaderiabovina.blogspot.com/2015/03/anatomia-del-tracto-genital-de-la-vaca.html>
- Matamoros. (2002). Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria. Recuperado de <http://mingaonline.uach.cl/pdf/amv/v342/art03.pdf>
- Nebel, D. R. (2011). Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina. *Select Reproductive*. Recuperado de <http://geneticaselecta.net/Anatomia%20y%20fisiologia%20Bovinos.pdf>
- Ochoa, R. (2005). TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN VACUNOS DE LECHE. Recuperado de <file:///C:/Users/DANNY/Downloads/1133-Texto%20del%20art%C3%ADculo-2897-1-10-20160401.pdf>
- Palma. (2001). RECOLECCION DE LOS EMBRIONES. *reprobiotec*. Recuperado de http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_06.pdf
- Pelaez, V. A. (2011). PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
- Perez, L. A. (Junio de 2011). Transferencia de embriones en bovinos. Recuperado de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3162/MIGUEL%20ANGEL%20PC9REZ%20LOPEZ.pdf?sequence=1>
- Pitty, J. L. (Noviembre de 2012). Concentración de progesterona y porcentaje de preñez en vacas tratadas con GnRH pos inseminación artificial. Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1080/1/T3354.pdf>
- Ramírez, O. A. (20 de Mayo de 2013). Dinámica folicular bovina. *Engormix*. Recuperado de <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/dinamica-folicular-bovina-t30124.htm>
- Rivera, M. G. (2016 de Noviembre de 2006). MANUAL DE BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA EN BOVINOS. *blogspot.com*. Recuperado de <http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com/p/trasferencia-de-embriones.html>

- Rodriguez, F. (Octubre de 2006). Manual de Transferencia de Embriones en el Ganado Bovino. Recuperado de <http://services.sistelligent.com/ProyectosWeb/ProduceChiapas/Contenido/documentos/manuales/Transferencia%20de%20Embriones%20en%20el%20Ganado%20Bovino.pdf>
- Salazar. (Octubre de 2006). Recuperado de <http://Endocrinologia.de.la.Reproduccion.com>
- Sartori. (s.f.). MORTALIDAD EMBRIONARIA EN BOVINOS LECHEROS. Recuperado de <http://www.syntexar.com/descargas/4Espanol%20Sartori-Morte%20embr.pdf>
- Serrano, J. (2009). Superovulación en bovinos. *Prosegan*. Recuperado de <http://jairoserano.com/2009/01/superovulacion-en-bovinos/>
- Sintex. (2005). *Laboratorio de Especialidades Veterinarias*. Recuperado de <http://www.infogranjas.com.ar/sanidad-animal/132-reproduccion/3041-fisiologia-reproductiva-del-bovino>
- Stevenson, J. L. (2012). Concentración de progesterona y porcentaje de preñez en vacas tratadas con GnRH pos inseminación artificial. Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1080/1/T3354.pdf>
- Tovio, N. (Mayo de 2013). Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. Recuperado de <http://wb.ucc.edu.co/sdmvz/files/2013/05/articulo-5-v-8-n-17.pdf>
- Yanguma, C. (26 de Agosto de 2009). APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA BOVINA. Recuperado de <http://reproduccioncarlos.blogspot.com/2009/08/aparato-reproductor-de-la-hembra-bovina.html>

13. ANEXOS

Anexo 1.-

Anexo 2.- Selección de donadoras

Anexo 3.- Sincronización de donadoras y aplicación de FSH para la superovulación



Anexo 4.- Inseminación de donadoras

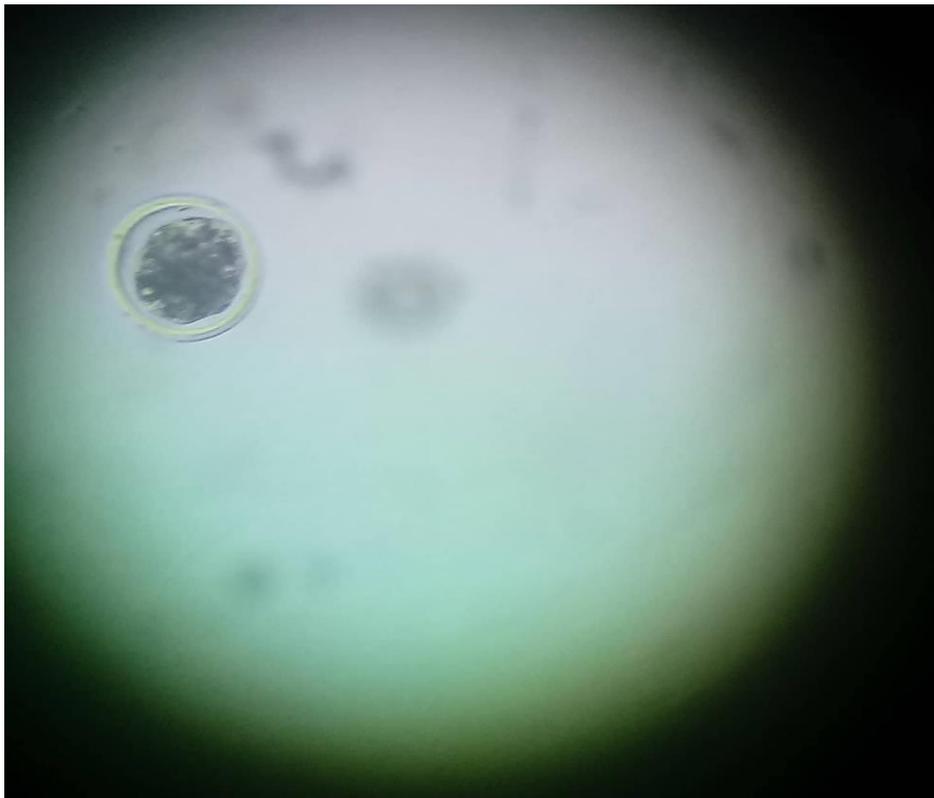
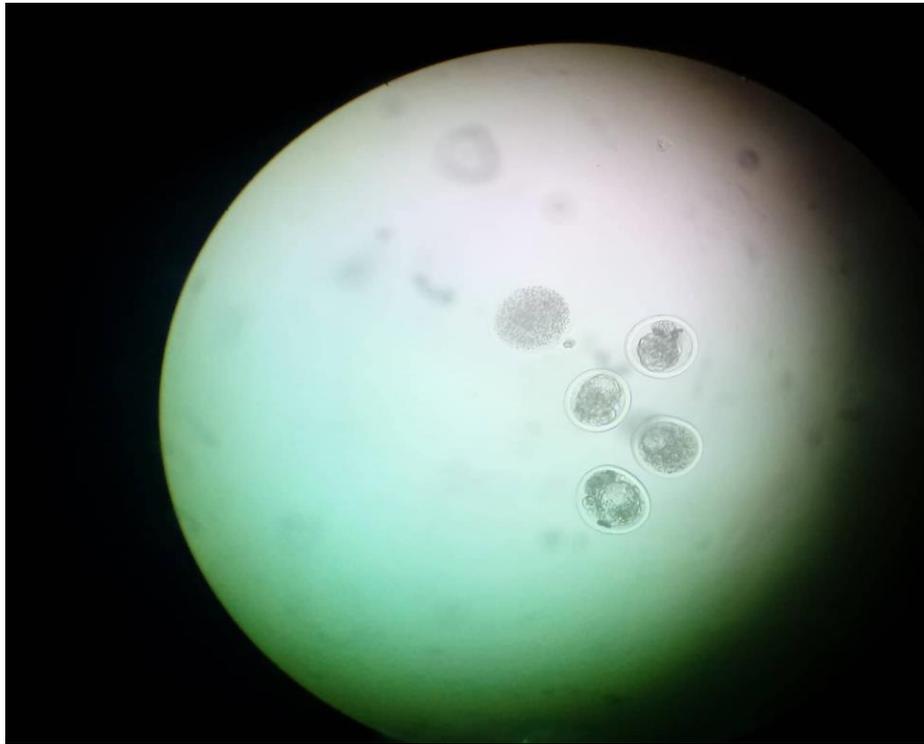


Anexo 5.- Lavado de embriones



Anexo 6.- Visualización, calificación y valoración de los embriones obtenidos





Anexo 7.- Toma de muestras

