



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE
LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD
EMBRIONARIA EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS
HORMONALES DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS
GIROLANDO**

**AUTORES: CORREA ROMERO EDWIN JAVIER
HEREDIA CUICHÁN BETY ELIZABETH**

DIRECTOR: VALDIVIESO PLAZA FÉLIX

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, *“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD EMBRIONARIA EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS HORMONALES DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS GIROLANDO”* realizado por la señorita *BETY ELIZABETH HEREDIA CUICHÁN* y el señor *EDWIN JAVIER CORREA ROMERO*, ha sido revisado en su totalidad y analizado por software anti-plagio, el mismo que cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita *BETY ELIZABETH HEREDIA CUICHÁN* y el señor *EDWIN JAVIER CORREA ROMERO* para que lo sustenten públicamente.

Sangolquí, 07 de septiembre del 2017

Dr. FÉLIX VALDIVIESO PLAZA

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Nosotros, **BETY ELIZABETH HEREDIA CUICHÁN**, con la cédula de identidad N° 1723402689 y **EDWIN JAVIER CORREA ROMERO**, con la cédula de identidad N° 1717750184, declaramos que este trabajo de titulación **“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD EMBRIONARIA EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS HORMONALES DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS GIROLANDO”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaramos que este trabajo es de nuestra autoría, en virtud de ello nos declaramos responsables del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 07 de septiembre del 2017

BETY ELIZABETH HEREDIA CUICHÁN

C.C. 1723402689

EDWIN JAVIER CORREA ROMERO

C.C. 1717750184



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Nosotros, **BETY ELIZABETH HEREDIA CUICHÁN** y **EDWIN JAVIER CORREA ROMERO** autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD EMBRIONARIA EN RESPUESTA A DOS PROTOCOLOS HORMONALES DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS GIROLANDO**” cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 07 de septiembre del 2017

BETY ELIZABETH HEREDIA CUICHÁN
C.C. 1723402689

EDWIN JAVIER CORREA ROMERO
C.C. 1717750184

DEDICATORIA

A la mayor bendición de mi vida mis padres (Douglas y Manuela), son mi ejemplo de honestidad, perseverancia y trabajo. Mis hermanos (Jozz y Alejo) por su gran apoyo

Betito

DEDICATORIA

A querido Dios por proporcionarme la fortaleza, sabiduría, paciencia y ganas de seguir adelante en este camino en la obtención del título de ingeniero agropecuario.

A mis padres Luis Hernán Correa de la Vega y Enma Marina Romero Ruiz quienes me apoyaron en toda mi vida al igual que mis hermanos han sabido cumplir este papel a carta cabal.

A mis docentes quienes han formado en mí grandes valores y gracias a ellos he podido culminar este arduo camino académico.

A mí estimada amiga Betty Elizabeth Heredia Cuichan y Joffre Paul Añazco Chávez por su apoyo en nuestra investigación

A mi estimado Rosendo Porfirio Romero Ruiz quien ha facilitado su apoyo incondicional durante toda mi vida.

Gracias.

Edwin Javier Correa Romero.

AGRADECIMIENTO

A mis padres por ser mi ejemplo de perseverancia y trabajo, por todo el apoyo y amor que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis maestros por ser guías en mi carrera universitaria, en especial al Doctor Ulloa que compartió sus conocimientos de manera desinteresada.

A mis amigos “Abejos” (Alejo, Magico, Dianita, Sory y Katita) porque siempre seremos el mejor equipo de trabajo

Betito

AGRADECIMIENTO

A Dios por facilitarme fuerzas durante toda la carrera y en especial en el desarrollo de la tesis.

A toda mi familia por darme apoyo incondicional en todo momento.

A mi querida Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE – IASA II por darme la oportunidad ser parte de tan gran Institución Educativa.

A mí estimado Director de tesis y Docente el Doctor Félix Valdivieso Plaza.

Al Doctor Gelacio Gómez, PhD Cesar Ulloa y el Ingeniero Andrés Vargas por su gran ayuda durante todo el desarrollo del proyecto.

A mi compañera y amiga Betty Elizabeth Heredia Cuichan por su gran comprensión y apoyo en nuestra investigación.

A mis grandes amigos Joffre Paul Añazco, Rosendo Romero y al Sgto. Rafael Antonio Torres Gómez por esa amistad totalmente desinteresada.

Edwin Javier Correa Romero.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA

CERTIFICACIÓN	ii
RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Antecedentes	1
1.3 Justificación	2
1.4 Objetivos	3
1.4.1 Objetivo general	3
1.4.2 Objetivos específicos	3
1.5 Hipótesis	3

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO	4
2.1 Ciclo Estral	4

2.1.1	Regulación Endocrina del Ciclo Estral Bovino	4
2.1.2	Fisiología del Ciclo Estral.....	6
2.1.3	Fases del Ciclo Estral Bovino	8
2.1.3.1	Fase folicular o regresión lútea.....	8
2.1.3.2	Fase luteal	9
2.1.4	Dinámica Folicular.....	10
2.2	Superovulación en Ganado Bovino	11
2.2.1	Definición e Importancia	11
2.2.2	Inducción a la Superovulación.....	12
2.2.3	Factores que afecta las repuestas Superovulatorias	14
2.2.4	Gonadotropinas utilizadas para tratamientos superovulatorios	15
2.2.4.1	Gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG)	15
2.2.4.2	Hormona Folículo Estimulante (FSH)	16
2.2.4.3	Gonadotropina menopáusic humana (hMG)	16
2.3	Desarrollo Embrionario	16
2.3.1	Estadios de Desarrollo Embrionario	18
2.4	Colecta de Embriones Bovinos.....	20
2.4.1	Evaluación de embriones bovinos	21
2.4.2	Criterios de calidad embrionaria.....	21

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOLOGÍA	22	
3.1	Ubicación del área de investigación	22
3.1.1	Ubicación política	22
3.1.2	Ubicación geografía	22
3.1.3	Ubicación ecología.....	22
3.2	Materiales.....	22
3.2.1	Material experimental	22

3.2.2	Material complementario	23
3.2.2.1	Sincronización de celo	23
3.2.2.2	Superovulación	23
3.2.2.3	Inseminación artificial	23
3.2.2.4	Lavado uterino y colecta de embriones	23
3.2.2.5	Evaluación de embriones	24
3.2.2.6	Crio preservación de embriones.....	24
3.2.2.7	Esterilización, higiene y limpieza	24
3.2.2.8	Equipos extra	25
3.3	Métodos.....	25
3.3.1	Diseño Experimental.....	26
3.3.1.1	Factores	26
3.3.1.2	Tratamientos	26
3.3.1.3	Esquema del diseño experimental.....	26
3.3.1.4	Análisis estadístico.....	26
3.3.1.5	Variables a medir	27
3.3.2	Métodos específicos de manejo del experimento	30
3.3.2.1	Capacitación de reconocimiento de anatomía y fisiología del tracto reproductivo	30
3.3.2.2	Preparación de hembras bovinas donantes	31
3.3.2.3	Procedimiento para la colecta de embriones.....	33
3.3.2.4	Procedimiento para la búsqueda de embriones	34
3.3.2.5	La evaluación de la calidad de los embriones.....	34
3.3.2.6	Congelación de los embriones	35

CAPITULO IV**RESULTADOS Y DISCUSIÓN 36**

4.1	Número de embriones colectados por cada unidad experimental y tratamiento.	36
4.2	Grados de calidad embrionaria	38
4.3	Estadio de desarrollo embrionario	41
4.4	Número de cuerpos lúteos vs embriones colectados.....	43
4.5	Crecimiento folicular	47
4.6	Discusión.....	48

CAPÍTULO V**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 52**

5.1	Conclusiones	52
5.2	Recomendaciones	53
5.3	Bibliografía	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Estadio de desarrollo embrionario	30
Tabla 2	Número de embriones por cada unidad	36
Tabla 3	Respuesta superovulatoria (media \pm EE)	38
Tabla 4	Grados de calidad embrionaria obtenidos con	39
Tabla 5	Estado de desarrollo embrionario obtenidos con	42
Tabla 6	Relación entre número de cuerpos lúteos y embriones.....	44
Tabla 7	Media \pm desviación estándar del diámetro.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema del eje hipotálamo hipotálamo-hipófisisgonadal.....	6
Figura 2	Fases del ciclo estral en la hembra bovina.....	9
Figura 3	Dinámica folicular durante un ciclo estral.....	11
Figura 4	Superovulación y ciclo estral en Bovinos.....	12
Figura 5	Esquema de un protocolo tradicional de superovulación	13
Figura 6	Esquema de un protocolo de superovulación a tiempo fijo.....	14
Figura 7	Esquema del desarrollo y tránsito embrionario en Bovinos	18
Figura 8	Estadios de desarrollo embrionario	20
Figura 9	Modelo de esquema para los tratamientos 1 y 2.....	26
Figura 11	Embriones excelentes o buenos (I).....	28
Figura 10	Embriones regulares (II).....	28
Figura 12	Embriones muertos o degenerándose (II).....	29
Figura 13	Embriones Malos (III)	29
Figura 14	Tratamiento 1 (con FSHp).....	32
Figura 15	Tratamiento 2 (con eCG).....	32
Figura 16	Esquema del circuito cerrado con flujo continuo	34
Figura 17	Diseño del llenado de la pajuela con un embrión congelado.....	35
Figura 18	Embriones colectados en base al tratamiento superovulatorio.....	37
Figura 19	Porcentaje de embriones colectados para cada uno de los grados de calidad embrionaria	40
Figura 20	Respuesta superovulatoria en base a los grados de calidad embrionaria (%) de donantes tratadas con dos protocolo de superovulación	41
Figura 21	Porcentaje de embriones colectados para cada uno de los estadios de desarrollo embrionario obtenidos con dos protocolos de superovulación.....	43
Figura 22	Relación entre el número de cuerpos lúteos y embriones colectados por cada vaca donante, obtenidos por el protocolo con eCG.....	45

Figura 23 Relación entre el número de cuerpos lúteos y embriones colectados por cada vaca donante, obtenidos por el protocolo con FSH-p	46
Figura 24 Crecimiento folicular durante la aplicación de gonadotropinas (eCG -FSH-p) en un protocolo de superovulación	48

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la calidad y cantidad embrionaria en respuesta a dos protocolos hormonales de superovulación, se seleccionaron ocho vacas de la raza Girolando, las cuales fueron sometidas a dos tratamientos superovulatorios con FSH y eCG. En la investigación se realizó chequeos ecográficos, sincronización de celo, superovulación, la inseminación artificial, lavado uterino, colecta de embriones y evaluación de la respuesta superovulatoria. Las variables a medir fueron: número de embriones colectados por cada unidad experimental y por tratamiento, grados de calidad y estadios de desarrollo embrionario. Los resultados experimentales se sometieron a un análisis estadístico descriptivo con las pruebas de Chi cuadrado (X^2) y de t-student para comparar el efecto de los tratamientos. El tratamiento superovulatorio con FSH-p con el cual se obtuvo un total de 43 embriones, superando en un 45.76% al tratamiento con eCG, además alcanzó la mayor producción de embriones de buena calidad que corresponde Grado I (34.88%) y II (39.53%). La mayor producción de embriones colectados en estadio de desarrollo de blastocisto temprano (16.28%), blastocisto (27.91%) y blastocisto expandido (2.33%) se obtuvo con el tratamiento superovulatorio con FSH-p, mientras que los dos tratamientos superovulatorios produjeron un porcentaje semejante de embriones en estado de mórula con un 37,00% (*chi-cuadrado*: 16.30, p: 0.0225). Al comparar los dos protocolo de superovulación podemos determinar que el protocolo que utiliza FSH-p presentó una mejor respuesta ovárica, reflejada en el número se ovulaciones 67 (cuerpo lúteo), frente al protocolo de superovulación con eCG que registró 50 cuerpos lúteos.

PALABRAS CLAVES

- **SUPEROVULACIÓN**
- **HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH-p)**
- **GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG)**
- **CALIDAD Y DESARROLLO EMBRIONARIO**

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate embryonic quality and quantity in response to two hormonal superovulation protocols, eight cows of the Girolando breed were selected, which were submitted to two superovulatory treatments with FSH and eCG. The research included ultrasound checks, estrus synchronization, superovulation, artificial insemination, uterine lavage, embryo collection and evaluation of the superovulatory response. The variables to be measured were: number of embryos collected per experimental unit and by treatment, quality grades and stages of embryonic development. The experimental results were subjected to a descriptive statistical analysis using Chi square tests (X^2) and t-student tests to compare the effect of treatments. The superovulatory treatment with FSH-p with which a total of 43 embryos were obtained, surpassing in 45.76% to eCG treatment, also reached the highest production of good quality embryos corresponding to Grade I (34.88%) and II (39.53 %). The highest production of embryos collected at early development of blastocyst (16.28%), blastocyst (27.91%) and expanded blastocyst (2.33%) was obtained with superovulatory treatment with p-FSH, whereas the two superovulatory treatments produced a percentage similar to embryos in the morula state with 37.00% (chi-square: 16.30, p: 0.0225). When comparing the two superovulation protocols we can determine that the protocol using FSH-p showed a better ovarian response, reflected in the number of ovulations 67 (corpus luteum), compared to the superovulation protocol with eCG that recorded 50 corpora lutea

KEY WORDS

- **SUPEROVULATION**
- **STIMULATING FOLLICLE HORMONE (FSH-p)**
- **EQUINE CORONARY GONADOTROPIN (eCG)**
- **QUALITY AND EMBRYONIC DEVELOPMENT**

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

El eje fundamental para el mejoramiento genético es lograr reproducir animales de mayor valor comercial mediante el uso de las biotecnologías como la sincronización de celo, superovulación y transferencia de embriones, biotecnologías que permitan incrementar la cantidad de descendientes en el menor tiempo posible. Los tratamientos superovulatorios aumentan el número fisiológico de ovulaciones por cada ciclo estral, permitiendo obtener una cantidad de crías superior a lo normal, de esta manera se aprovecha la capacidad reproductiva de hembra con alto valor genético.

1.2 Antecedentes

El desarrollo de una explotación ganadera tanto de leche como de carne, se basa en la mejora continua de los índices productivos del ganado bovino, esto depende en gran medida de la implementación de alternativas biotecnológicas aplicadas a la reproducción animal.

La aplicación de herramientas biotecnológicas en el área de reproducción como Inseminación Artificial (IA), Superovulación (SO), Transferencia de Embriones (TE) y la Fertilización In vitro de Ovocitos (FIV) han obtenido el mayor impacto en programas reproductivos de mejoramiento genético.

Actualmente en nuestro País, el uso de biotecnología en el área de reproducción animal, está siendo difundido; gracias a los programas de mejoramiento genético y difusión de la inseminación artificial, permitiendo la multiplicación de la población bovina con alto valor genético, cuyo principal objetivo es mejorar los parámetros productivos de los sistemas de producción de leche y carne. En la ganadería ecuatoriana existen animales de alto valor genético, cuyos beneficios no son aprovechados en su totalidad, estos animales al ser superovulados potencialmente podrán producir descendientes de buena genética, incluso después de haber terminado su vida productiva.

La superovulación, transferencia de embriones y la fertilización in vitro de ovocitos son las técnicas más utilizadas para reproducir animales de elite, la principal ventaja de estas técnicas es aumentar la capacidad reproductiva de una hembra de alto mérito genético y reducir el intervalo entre generaciones.

1.3 Justificación

Según datos estadísticos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) al efectuar la “Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2013” reportó que existe una población de 5'134 122 bovinos en el país, evidenciando una disminución frente a los 5'236 000 en el 2012 y los 5'359 000 en el 2011. El año 2013 la tasa anual de variación del ganado vacuno fue de -2,30% a nivel nacional, se observa que la región Sierra cuenta con mayor cantidad de ganado con un 50,64% del total nacional, seguida por la Costa con 36,30% y el Oriente con 13,07%.

La ganadería del Ecuador representa una parte importante de la producción agropecuaria del país, siendo el sector bovino uno de los rubros de producción más significativos. Actualmente el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Acuicultura (Magap) informó que llegarán al Ecuador, progresivamente, 840 vaconas de las razas Holstein Friesian y Kiwi Cross, animales que tiene aptitud lechera de origen neozelandés, desde Chile como parte del Plan de Mejoramiento Genético y Repoblamiento Bovino, este proyecto tiene como objetivo el incremento de índices productivos y reproductivos, tanto en el sector cárnico como lechero (MAGAP, 2015).

Frente al presente problema es necesaria la aplicación de alternativas biotecnológicas, que permitan la reproducción de animales de alto valor genético que se encuentran adaptados a las condiciones del País. Por lo tanto, la presente investigación se basa en la utilización de herramientas biotecnológicas como: sincronización de celos, superovulación, transferencia y crio-preservación de embriones que permiten el mejoramiento genético del ganado bovino, basándose en parámetros de aprovechamiento de hembras de alto mérito genético. El uso de la biotecnología en el área de reproducción animal, tiene un impacto positivo en la

industria pecuaria, logrando progresos genéticos en intervalos de tiempo más cortos (Mogollón & Burla, 2013).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar la calidad y cantidad embrionaria en respuesta a dos protocolos hormonales de superovulación en vacas Girolando

1.4.2 Objetivos específicos

- Establecer el número de embriones colectados por cada unidad experimental y por tratamiento.
- Evaluar la calidad de los embriones colectados de acuerdo a parámetros establecidos (características ópticas de tamaño, forma, apariencia, simetría de las células embrionarias).
- Evaluar el estadio de desarrollo de los embriones (características ópticas de la morfología de acuerdo a las normas International Embryo Transfer Society-IETS).
- Difundir los resultados obtenidos en la investigación a través de medios de difusión a productores ganaderos y estudiantes.

1.5 Hipótesis

Ho: No existe diferencia de calidad y cantidad embrionaria, aplicando dos protocolos hormonales de superovulación en vacas donantes.

Hi: Si existe diferencia de calidad y cantidad embrionaria, aplicando dos protocolos hormonales de superovulación en vacas donantes.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Ciclo Estral

El ciclo estral en la especie bovina (*Bos Taurus*; *Bos indicus*) comprende una serie de cambios endocrinos y morfo funcionales en el aparato reproductor femenino en respuesta a distintos niveles de hormonas secretados a nivel central (Hipotálamo-Hipófisis) y local (ovarios y útero), que ocurre en un periodo de tiempo comprendido desde un celo hasta el inicio del siguiente celo. El estro o celo se presentan en promedio cada 21 días, con un rango de 18 a 24 días en hembras bovinas no gestantes (Iñiguez, 2010). El ciclo estral es una actividad compleja, en la cual intervienen el sistema nervioso central, distintos órganos y hormonas producidas en el hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero (DeJarnette & Nebel, 2007).

2.1.1 Regulación Endocrina del Ciclo Estral Bovino

El ciclo estral está regulado por mecanismos endocrinos y neuroendocrinos; esto es, por el hipotálamo mediante la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la pituitaria anterior la que secreta las hormonas folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), y a nivel ovárico secreta progesterona, (P_4); estradiol, (E_2); inhibina y oxitocina y el útero secreta prostaglandina $F_{2\alpha}$, ($PGF_{2\alpha}$) (Atuesta & Gonella, 2011). El ciclo estral está regulado por estas hormonas a través de un sistema de retroalimentación positiva y negativa.

La regulación de la secreción de la GnRH demanda un equilibrio entre las interacciones hormonales y se presenta de dos formas: una secreción tónica desde el centro tónico del hipotálamo responsable de la secreción basal de GnRH y una secreción preovulatoria que estimula el pico preovulatorio de LH, anteriormente se creía que su secreción era estimulada directamente por el E_2 . Sin embargo en la actualidad se conoce que los receptores de E_2 no se encuentran en las neuronas secretoras de GnRH (Colazo & Mapletoft, 2014). Un grupo de neuronas hipotalámicas que expresan el gen kiss-1 que codifica el péptido kisspeptina, se ha demostrado que dicho péptido es un potente estimulador de la secreción de GnRH (Gottsch et al., 2004 citado por (Colazo & Mapletoft, 2014).

Durante el ciclo estral en la fase folicular se produce una disminución abrupta en las concentraciones de progesterona plasmática, mientras que las concentraciones de E_2 se incrementan proveniente del folículo dominante preovulatorio; esto, induce un pico preovulatorio de GnRH por lo tanto se produce un pico de gonadotropinas hipofisiarias FSH y LH (en especial esta última). El incremento en las concentraciones de estradiol, junto con la disminución en las concentraciones de progesterona, provocan cambios en el comportamiento del animal; es decir que la hembra es sexualmente receptiva (Atuesta & Gonella, 2011).

El pico preovulatorio de LH induce la ovulación que ocurre 27 horas después de haber iniciado el estro, a continuación se produce la luteinización de las células de la teca y granulosa (Atuesta & Gonella, 2011). Durante los primeros 3-4 días se produce la formación del cuerpo lúteo (CL) esta fase se denomina Metaestro. En el siguiente periodo las concentraciones de progesterona se incrementan, debido a la formación y síntesis de P4 por parte del cuerpo lúteo en crecimiento, siendo la P4 la hormona necesaria para el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Durante el Diestro existe crecimiento folicular, sin embargo estos folículos no tienen la capacidad para ovular debido a que la P4 ejerce una retroalimentación negativa sobre la GnRH, factor que impide la secreción de pulsos LH adecuados para la ovulación del folículo presente (Colazo & Mapletoft, 2014).

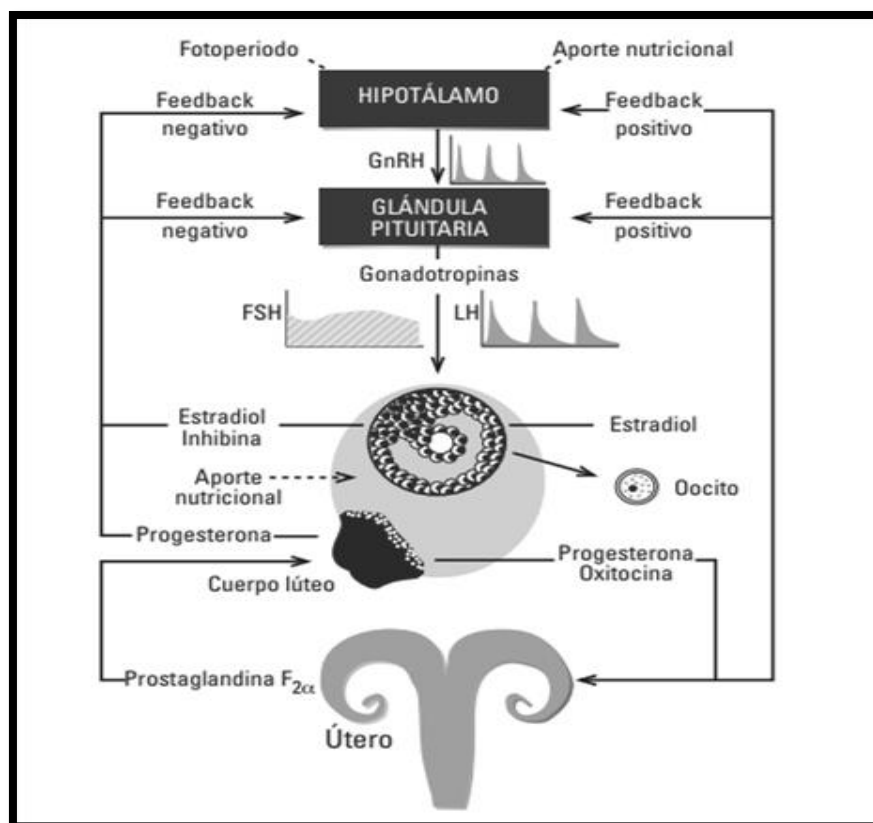


Figura 1 Esquema del eje hipotálamo hipotálamo-hipofisario-gonadal

Fuente: (Colazo & Mapletoft, 2014)

2.1.2 Fisiología del Ciclo Estral

El ciclo estral da inicio con un animal en celo o receptividad sexual esto se conoce como día 0. En el aparato reproductor del animal sucede varios eventos como: el desarrollo folicular en el ovario, bajo la influencia de la FSH provocando el crecimiento de un grupo de folículos antrales de los cuales solo uno alcanzará su máximo tamaño que será denominado preovulatorio todo este fenómeno de crecimiento folicular se conoce como crecimiento de ondas foliculares. El folículo al completar su desarrollo, contiene un óvulo maduro rodeado de células que se encargan de liberar estradiol, este es responsable de inducir la conducta sexual, donde sus signos más característicos son: enrojecimiento e inflamación de la vulva, pérdida del apetito, mugir frecuentemente, mantener erecta las orejas, descarga de moco claro por la vagina, intenta montar otras vacas y permite que otras vacas la monten (DeJarnette & Nebel, 2007).

El estradiol es responsable de cambios fisiológicos en el aparato reproductor como: el aumento de la síntesis de proteínas por parte de las glándulas presentes en el lumen del endometrio, produciéndose una secreción abundante, que facilita la capacitación de los espermatozoides, además hay secreción de moco cervical y vaginal; cuya finalidad es el transporte de espermatozoides al útero (Gutiérrez, Rangel, & Lassala, 2012).

Cuando el folículo en crecimiento bajo la influencia de FSH alcanza su máximo diámetro tiene la capacidad de responder a la LH por la expresión de receptores para esta hormona a nivel de las células que rodea al ovocito, cuando la LH alcanza su máxima concentración en la sangre por efecto de la retroalimentación positiva por parte de los estrógenos induce la ruptura del folículo maduro y permite la liberación del óvulo y del contenido folicular, este fenómeno se conoce como día 1. Tras el proceso de ovulación, el óvulo es recogido por el infundíbulo, mediante los cilios de la pared de la fimbria y transportado hacia el ámpula, permitiendo su fertilización en la parte interna de esta estructura (DeJarnette & Nebel, 2007).

En el sitio donde se encontraba el folículo, a partir de las células presentes en paredes de este (células de la teca y granulosa) y por acción previa de la LH se produce una transformación de estas células, las que se denomina Células Luteínicas; formando una estructura glandular conocida como cuerpo lúteo (Iñiguez, 2010).

La progesterona es responsable de la preparación del útero para una posible gestación es producida por el CL. Bajo la influencia de la progesterona el útero es responsable de la producción de una sustancia nutritiva llamada leche uterina para el embrión, al mismo tiempo la (P4) causa que se forme un tapón mucoso en el cérvix, impidiendo la entrada de agentes patógenos al útero e inhibe la liberación de hormonas gonadotropinas (FSH y LH), mediante la retroalimentación negativa a nivel hipotalámico, evitando que el animal vuelva al celo (DeJarnette & Nebel, 2007).

2.1.3 Fases del Ciclo Estral Bovino

El ciclo estral se caracteriza por tener dos fases, dependiendo de las estructuras ováricas predominantes: la fase folicular subdividida en proestro y estro; y la fase lútea subdividida en metaestro y diestro, respectivamente.

2.1.3.1 Fase folicular o regresión lútea

Proestro: esta fase tiene una duración de 3 o 4 días (corresponde al día 17-21 del ciclo estral), comienza cuando ocurre la regresión del CL o luteólisis del ciclo anterior, siendo la PGF2 α el agente luteolítico y finaliza con la receptibilidad sexual (Callejas, 2001).

En el momento de la regresión del cuerpo lúteo, se produce una rápida disminución de la concentración de progesterona, reduciendo la retroalimentación negativa que esta hormona ejerce a nivel hipotalámico y de esta manera se reinicia la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotropinas (FSH y LH), por medio de la liberación de la GnRH estimulando el proceso de crecimiento y desarrollo folicular medido en primer lugar por la FSH cuando el folículo alcanza su máximo diámetro se denomina preovulatorio, el cual secreta e incrementa los niveles de estrógeno circulantes, provocando las manifestaciones externas de celo por estímulo de estos estrógenos a nivel central (Sintex, 2005).

Estro: esta fase tiene una duración de 2 a 24 horas, inicia con la receptividad sexual e involucra todos los eventos fisiológicos que permiten la ovulación e iniciación de la formación del cuerpo lúteo (Callejas, 2001).

Las altas concentraciones de estradiol permiten obtener la madurez y tamaño preovulatorio del folículo en desarrollo. Durante esta fase se ejerce una retroalimentación positiva entre el estradiol y la LH produciéndose el pico preovulatorio de LH responsable de la ovulación (Gutiérrez, Rangel, & Lassala, 2012). Luego de 12 a 24 horas después de comenzado el celo, el sistema nervioso de animal se torna remiso al estradiol y finaliza todas las manifestaciones de celo (Callejas, 2001).

2.1.3.2 Fase luteal

Metaestro: se inicia inmediatamente después de finalizar el celo con la ovulación y concluye cuando el CL alcanza su máximo diámetro. En este periodo sucede la ovulación de 28 a 32 horas de iniciado el celo, en respuesta al pico ovulatorio de LH. En el sitio donde se produjo la ovulación sigue una hemorragia y el folículo se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico, que es transitoria. Durante esta fase se inicia la organización celular y desarrollo del CL; las células de la granulosa y de la teca del folículo sufre un proceso llamado luteinización por acción del alza de la LH preovulatoria (Rippe, 2009).

Diestro: es la fase más larga del ciclo estral, debido a que comprende desde que el CL es funcional hasta la destrucción del mismo, por medio del proceso de apoptosis mediado por la $\text{PGF2}\alpha$ denominado luteólisis. Durante esta fase se mantiene altas concentraciones de progesterona y se produce un efecto negativo en la liberación de LH; así como la secreción de GnRH. Además se observa incrementos en la secreción de FSH y en consecuencia un desarrollo folicular; sin embargo estos folículos no pueden concluir su maduración y sufren a una regresión, por falta del pico de LH (Callejas, 2001).

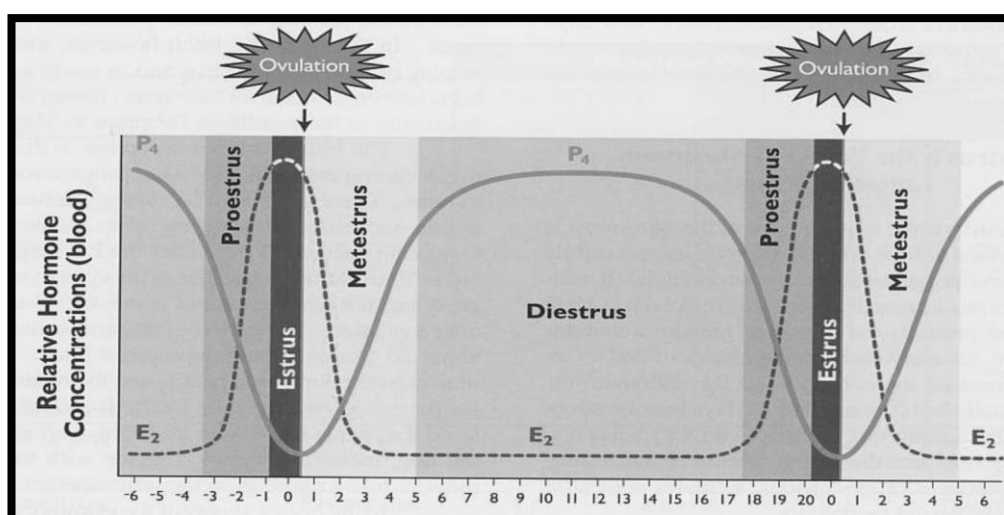


Figura 2 Fases del ciclo estral en la hembra bovina

Fuente: (Senger, 2003)

2.1.4 Dinámica Folicular

La dinámica folicular es un proceso continuo de crecimiento sincrónico de un grupo de folículos y regresión de folículos primordiales que conlleva al desarrollo de un folículo preovulatorio. La tasa de crecimiento folicular en los dos primeros días es similar en todos los folículos (de 8-41), luego un folículo es seleccionado y continúa su desarrollo de forma más rápida que el resto, impidiendo el crecimiento de los folículos subordinados y el reclutamiento de un nuevo grupo de folículos (Colazo & Mapletoft, 2014).

El desarrollo folicular se manifiesta mediante un crecimiento en patrón de ondas o grupos. En cada oleada un grupo de folículos es reclutado para que abandone el estado de latencia e inicie el proceso de crecimiento. Se observa tanto en animales jóvenes como adultos durante la pubertad, preñez (excepto en los últimos 30 días de gestación y periodo de posparto) (Rippe, 2009).

El proceso de desarrollo folicular se divide en tres etapas:

Reclutamiento: en cada ciclo ovárico es reclutado un grupo de folículos primordiales, los cuales por efecto de las altas concentraciones de la hormona FSH, mantienen un crecimiento continuo. El pico de FSH ocurre cuando el folículo dominante presenta un tamaño de aproximadamente 8 a 9 mm en bovinos (Rippe, 2009). La liberación de FSH gradualmente es suprimida, debido a que los folículos inician la secreción de estradiol e inhibina. La inhibina es una hormona proteica, producida por el folículo y ejerce una retroalimentación negativa a nivel hipofisiario, generando una menor secreción de FSH (Gutiérrez, Rangel, & Lassala, 2012).

Selección: proceso por el cual es elegido un folículo “dominante”, el folículo antes mencionado presenta una tasa de crecimiento constante y bloquea el soporte hormonal de FSH para el resto de folículos subordinados induciendo una atresia o disminución de la velocidad de crecimiento y reprimiendo su crecimiento como consecuencia de la secreción y liberación de la inhibina en el torrente sanguíneo (Gutiérrez, Rangel, & Lassala, 2012).

Dominancia: en esta fase el folículo dominante impide el crecimiento y desarrollo de los folículos subordinados así como el reclutamiento de un nuevo grupo de folículos primordiales (Rippe, 2009). El folículo dominante alcanza un gran tamaño y es responsable de la mayor producción de E_2 , presenta una capacidad de desarrollo continuo en un medio hormonal adverso para el resto de folículos (Sintex, 2005).

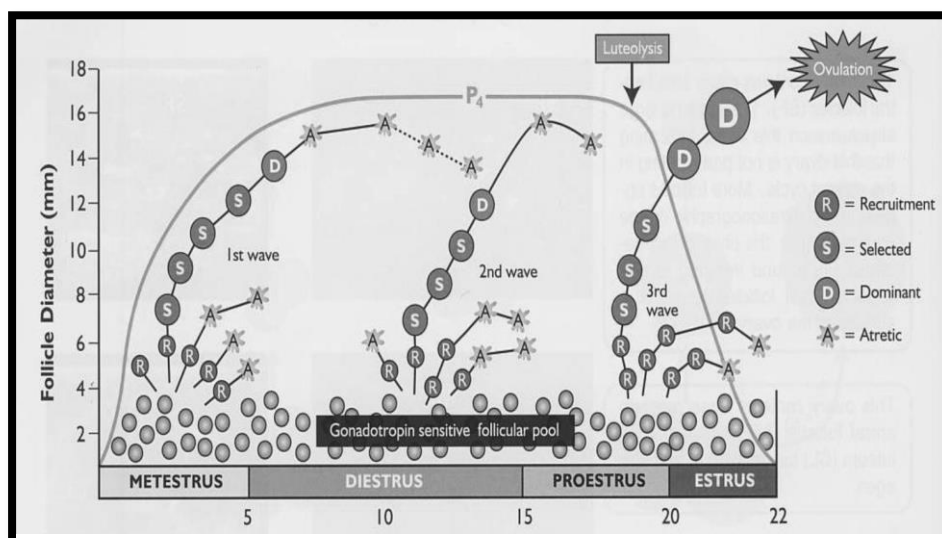


Figura 3 Dinámica folicular durante un ciclo estral

Fuente: (Senger, 2003)

2.2 Superovulación en Ganado Bovino

2.2.1 Definición e Importancia

La especie bovina es un animal monovular, es decir que generalmente libera un solo óvulo en cada ciclo estral, impidiendo la obtención de varias crías a la vez de manera natural. El principal objetivo de la superovulación es el estímulo hormonal de los ovarios, para aumentar el número fisiológico de ovulaciones en cada ciclo estral, mediante la aplicación de diferentes tipos de gonadotropinas como: la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG o PMSG) por mencionar algunas (Garzón, Urrego, & Giraldo, 2007).

La superovulación es una biotecnológica reproductiva fundamental para un programa de transferencia de embriones y el desarrollo científico de biotecnologías más avanzadas como: fertilización in vitro de ovocitos, sexado de embriones,

clonación y transgénesis, debido a que incrementa la disposición de ovocitos y embriones como material de investigación (Mogollón & Burla, 2013).

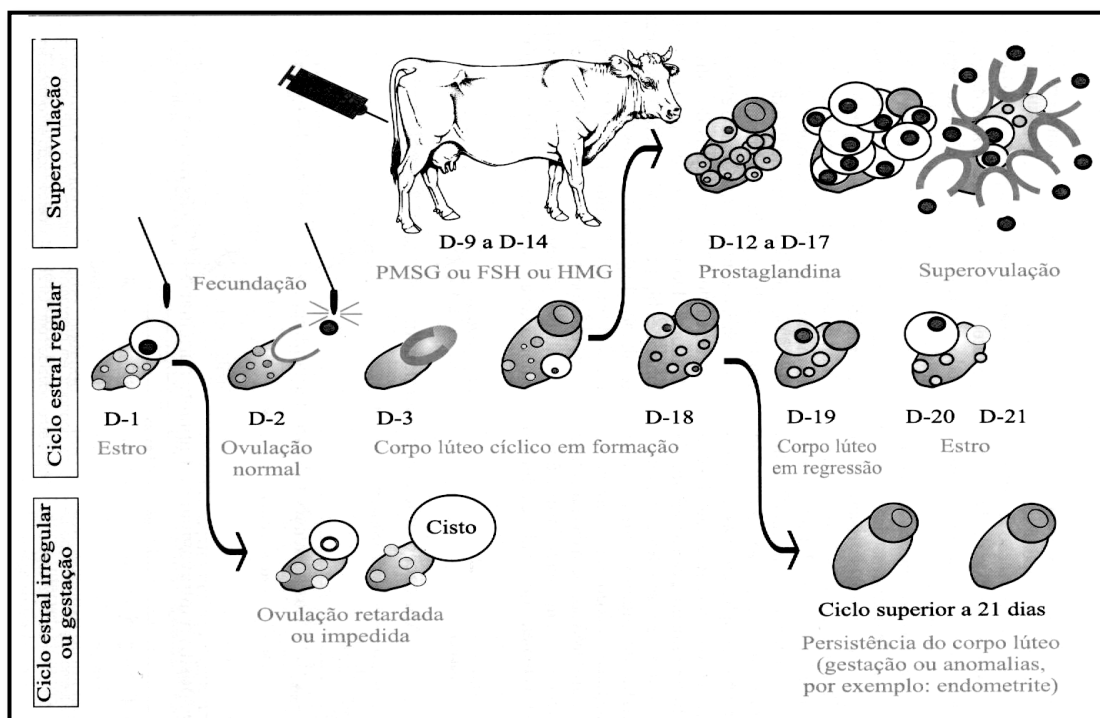


Figura 4 Superovulación y ciclo estral en Bovinos

Fuente: (Iñiguez, 2010)

2.2.2 Inducción a la Superovulación

Dentro de un programa de superovulación se debe considerar los protocolos tradicionales y los protocolos de tiempo fijo. En los protocolos tradicionales, se trabaja de acuerdo a la fisiología del ciclo estral y el tratamiento superovulatorio se inicia entre los días 8 y 12 del ciclo, mientras que la finalidad de los protocolos de tiempo fijo es sincronizar la onda folicular de varias hembra donantes y los tratamientos superovulatorios inician independientemente de la fase del ciclo estral (Becaluba, 2007).

Protocolo tradicional de superovulación: se inicia teniendo como base la detección del celo (Día 0), a partir del día 10 se aplica el tratamientos de superovulación, que consiste en aplicar FSH-p cada 12 horas durante un periodo de 4 o 5 días, debido a la vida media muy corta de la hormona (2 a 5 horas en el cuerpo de la vaca), tras 48 horas de comenzado el tratamiento superovulatorio se administra $PGF2\alpha$ (hormona luteinizante); por lo que normalmente se presenta celo a las 36 a 48 horas de haber administrado la $PGF2\alpha$, efectuando las inseminaciones artificiales, con o sin manifestaciones de celo a las 38 y 48 horas, después de aplicar la $PGF2$. Las vacas que presentan celo antes de lo esperado, no más de 24 horas, se les puede suspender la administración de FSH y se inseminan a las 12 y 24 horas de iniciado el celo. Efectuando el lavado, colecta y transferencia en fresco el día 21 del tratamiento superovulatorio (Becaluba, 2007).

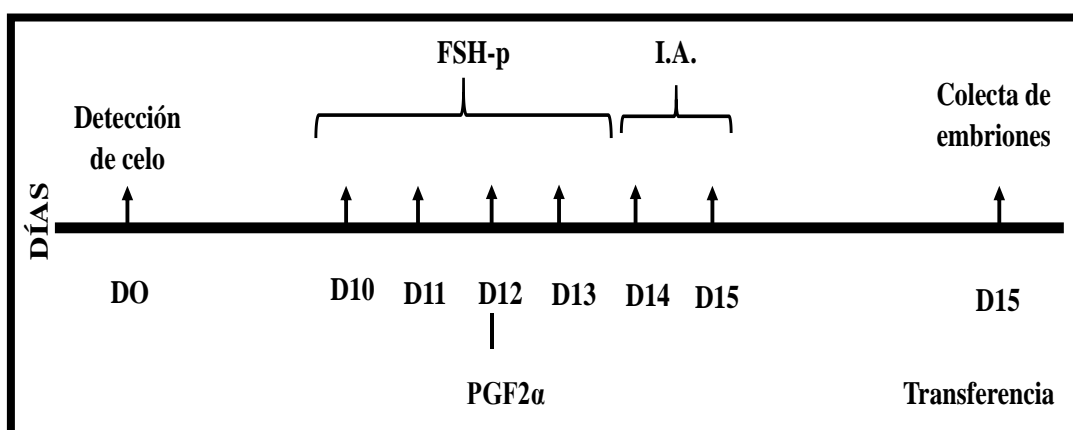


Figura 5 Esquema de un protocolo tradicional de superovulación

Fuente: (Becaluba, 2007)

Protocolo de superovulación a tiempo fijo: este programa permite un manejo de un mayor número de donadoras. El protocolo de superovulación empieza con una sincronización de celo (día 0), insertando un dispositivo intravaginal con 1,38 g de P4, junto con 2 ml de Benzoato de Estradiol (BE) y 2 ml de progesterona por vía intramuscular (IM). El día 4, inicia el tratamiento superovulatorio que consiste en aplica FSH-p por vía intramuscular cada 12 h, por un periodo de 4 días en dosis descendientes. En el día 6 se administra 2ml $PGF2\alpha$ cada 12 horas (IM); además es retirado el dispositivo intravaginal. En la mañana del día 8 se inyecta 2ml

GnRH; 24 horas después del retiro del dispositivo intravaginal. La IATF se realiza a las 12 y 24 horas después de la aplicación de GnRH. El lavado y colecta de embriones se realiza 7 días post-inseminación (Becaluba, 2007).

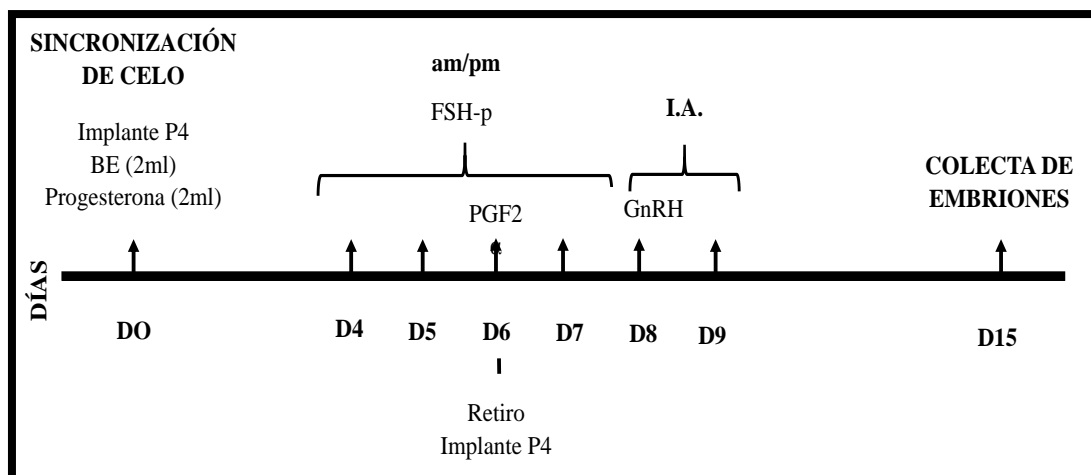


Figura 6 Esquema de un protocolo de superovulación a tiempo fijo

Fuente: (Becaluba, 2007)

2.2.3 Factores que afecta las repuestas Superovulatorias

La variabilidad en la respuesta a tratamiento superovulatorios; así como la producción de embriones involucra varios factores, dentro de ellos se encuentran:

Factores Externos: factores como el periodo del año, nutrición, manejo para detección de celo; además la respuesta superovulatoria puede verse afectada de manera directa o indirecta por el semen, debido a que tiene un efecto muy importante sobre el número de embriones obtenidos.

El estrés durante el manejo intensivo de animales sometidos a un programa de transferencia de embriones, es responsable de varias alteraciones fisiológicas, incluyendo la subfertilidad. El estado de estrés agudo pueden afectar el pico preovulatorio de LH en el ganado (Jiménez, 2009).

Factores fisiológicos: se plantea que el número de partos, estado lactacional, raza, edad, el estatus sanitario y reproductivo del animal, características de las ondas foliculares y dinámica folicular, tiene una influencia directa en la respuesta superovulatoria (Mogollón & Burla, 2013).

Existe cierta información acerca de la raza Jersey que no produce embriones tan resistentes y presentan menores tasas de preñez que las demás razas (Steel R, Hasler JF., 2004 citado por Jiménez, 2009). Existe una interrelación entre la edad y la dosis de gonadotropina; debido a que los animales jóvenes al ser tratados con altas cantidades de gonadotropinas se producen una sobre estimulación en el ovario, provocando que muchos folículos se desarrollen, pero no todos son capaces de ovular y la mayoría sufre una atresia o regresión. Al aumentar la edad de la hembra donante disminuye el número fisiológico de ovulaciones, tasa de fecundación y calidad embrionaria; la disminución del número de ovulaciones se debe a una menor disponibilidad de folículos en crecimiento (Lerner, S et al.; 1986 citado por Andino, 2014).

Factores farmacéuticos: la respuesta superovulatoria se relaciona con el tipo de FSH, productos utilizados y potencia, dosis, intervalos y por cuantos días es empleada los tratamientos superovulatorios (Jiménez, 2009).

2.2.4 Gonadotropinas utilizadas para tratamientos superovulatorios

En la inducción a la superovulación en hembras bovinas se ha usado tres diferentes tipos de gonadotropinas: la gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG), extracto de pituitaria de porcinos, ovinos y bovinos (FSH) y gonadotropina menopáusica humana (hMG).

2.2.4.1 Gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG)

Es una glicoproteína producida en el endometrio de las yeguas con 42 – 150 días de gestación, tiene una vida media prolongada debido a su elevado peso molecular (PROSEGAN, 2009). Mediante la administración de una dosis única entre los días 8 y 14 del ciclo estral, permite conseguir una respuesta superovulatoria (Sauman y Chupin, 1981 citado por Cabodevila & Torquati, 2001).

La estimulación ovárica prolongada provoca un crecimiento folicular continuo y disperso, con altos niveles de estrógeno que afectan a las tasas de fertilización y presenta un efecto negativo en el desarrollo embrionario (Cabodevila & Torquati, 2001). Esta hormona también tiene una respuesta inmunológica, factor que lleva a la producción de anticuerpos anti-eCG (Mogollón & Burla, 2013).

Según Cabodevila & Torquati, 2001; El suero anti-PMSG es utilizado para disminuir los efectos indeseables y mejorar parámetros de la respuesta superovulatoria en cuanto a número de ovocitos, calidad de embriones recolectados, disminución del periodo de celo y sincronización de la maduración folicular. La aplicación del suero anti-PMSG, permite la neutralización de la PMSG, al momento de la primera inseminación 12 - 18 horas después del inicio del celo.

2.2.4.2 Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Puede ser de origen ovino, porcino y equino o incluso la FSH recombinante bovina y la somatotropina bovina (bST) (Jiménez, 2009). La hormona FSH es la más utilizada en los tratamientos superovulatorios, se basa en la administración de dos dosis diarias durante 4 o 5 días cada 12 horas, debido a que tiene una vida media muy corta (aproximadamente 5 a 12 h), para conseguir que varios folículos se desarrollen y que ocurra la ovulación, la aplicación por lo general empieza entre los días 8 y 12 del ciclo estral de la hembra (Donaldson, 1984 citado por Cabodevila & Torquati, 2001).

2.2.4.3 Gonadotropina menopáusica humana (hMG)

Es una sustancia altamente purificada cuya administración es idéntica a la hormona folículo estimulante porcina (FSH-p) debido a que su vida media es muy corta. La aplicación de la hormona es por vía intramuscular cada 12 h, por un periodo de 4 a 5 días en dosis descendientes. La hormona presenta la misma concentración de FSH y LH (Becaluba, 2007). El uso de la hormona menopáusica humana (hMG) es principalmente en el ser humano debido a su alto costo.

2.3 Desarrollo Embrionario

Los factores que componen el desarrollo embrionario involucran procesos como la proliferación celular, el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo, activación de las funciones del oviducto y útero, la implantación y vascularización del embrión (Juárez & Valencia, 2012).

Con la ruptura del folículo se produce la expulsión del ovocito, bajo el efecto de los estrógenos (durante el estro) el pabellón del oviducto envuelve al ovario en un

cáliz, para recoger al óvulo y por medio de movimientos ciliares es transportado al infundíbulo y empieza su recorrido hacia la parte media del oviducto (ampolla), lugar donde el ovocito cumple con los últimos procesos de maduración y se produce la fecundación, proceso que dura aproximadamente 24 horas (Elli & Fatro, 2010).

Durante la etapa embrionaria temprana, el desarrollo del ovocito fecundado (cigoto) comienza mediante divisiones mitóticas proceso denominado segmentación y conduce a la formación de numerosas células pequeñas llamadas blastómeros. El día 4 después de la fecundación, alcanza el estadio de mórula que se presenta como una masa sólida, la cual está constituida por 16-64 células. El día 7 el embrión se denomina blástula o blastocisto, presenta una cavidad llena de líquido denominada blastocele; en el estadio de blastocisto se puede identificar una zona de células concretas que forman el disco o nudo embrionario del cual se deriva el embrión y la zona de células de la periferia que componen el trofoblasto, más tarde participan en la formación de las membranas extraembrionarias. El día 9 la zona pelúcida eclosiona y el embrión empieza a alargarse (Elli & Fatro, 2010).

El desarrollo embrionario temprano se produce mientras el embrión es transportado a lo largo del oviducto. Después de la fase migratoria del embrión se produce la implantación como consecuencia de la invasión del embrión en la luz del útero (Quintela, Díaz, García, Peña, & Becerra, 2006).

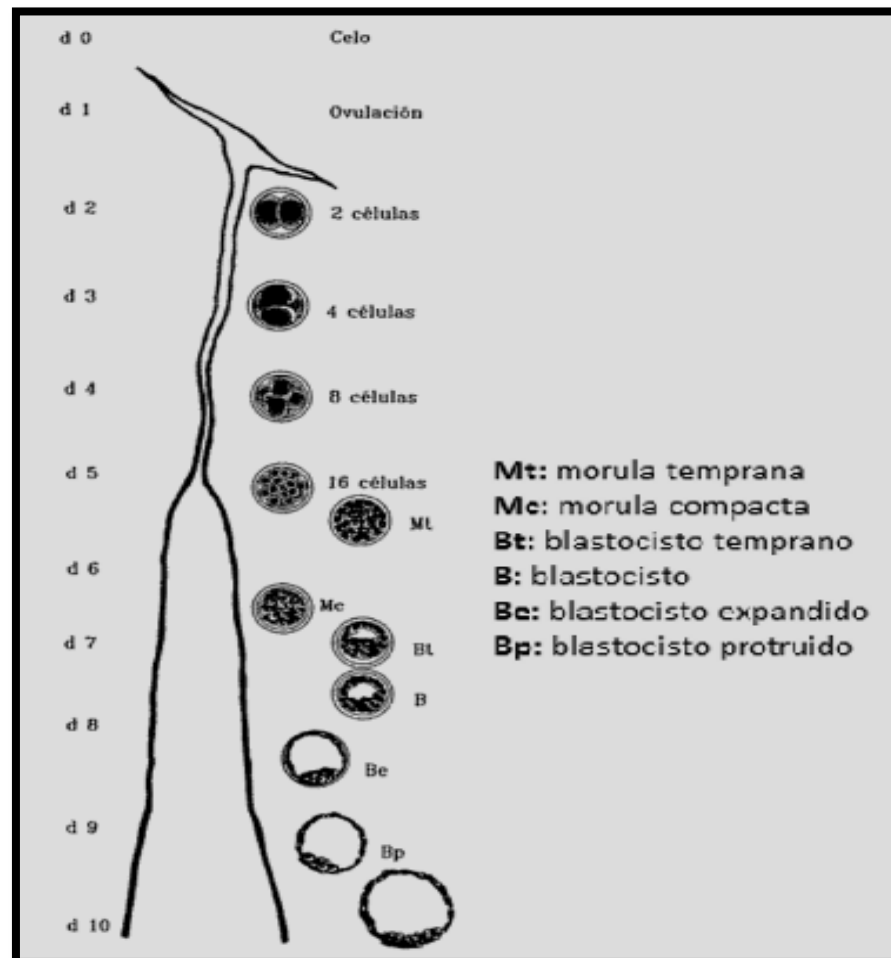


Figura 7 Esquema del desarrollo y tránsito embrionario en Bovinos

Fuente: (Palma, 2001)

2.3.1 Estadios de Desarrollo Embrionario

Mórula temprana (Mt): el día 5 del desarrollo embrionario tiene una forma similar a una mora, con un desarrollo de al menos 16 células. Los blastómeros es imposible distinguir individualmente. La masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino (Bó & Mapletoft, 2013).

Mórula compacta (Mc): 32-64 blastómeros que se encuentran unidos y forman una masa compacta; la compactación es considerada como uno de los signos de diferenciación embrionaria. La masa del embrión ocupa del 60 al 70% del espacio perivitelino (Pedersen, 1988 citado por Palma, 2001).

Blastocisto temprano (Bt): formado por 100 a 200 células que se caracterizan por el inicio del transporte de fluido y la formación de una cavidad llena de líquido llamada blastocele en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo de sello, ocupa del 70 al 80% del espacio perivitelino. El embrión en este estadio puede parecer de calidad dudosa, porque es difícil diferenciar las células de la masa interna de las células de la periferia (trofoblasto) (Bó & Mapletoft, 2013).

Blastocisto (B): formado por 100 a 200 células. Existe una diferencia entre las células del trofoblasto y la masa celular interna (disco o nudo embrionario), se presenta de forma más oscura y compacta. El embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino, el tamaño del blastocele es prominente (Bó & Mapletoft, 2013) .

Blastocisto expandido (Be): formado por más de 200 células. El diámetro del embrión se incrementa; mientras que se produce el adelgazamiento 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 (Palma, 2001).

Blastocisto eclosionado (Bp): Día 8-9 post fecundación, 200-800 células. Se produce la salida del embrión de la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocele bien definido o colapsado. Pueden ser igualmente transferidos, sin embargo, los embriones desprovistos de la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos (Palma, 2001).

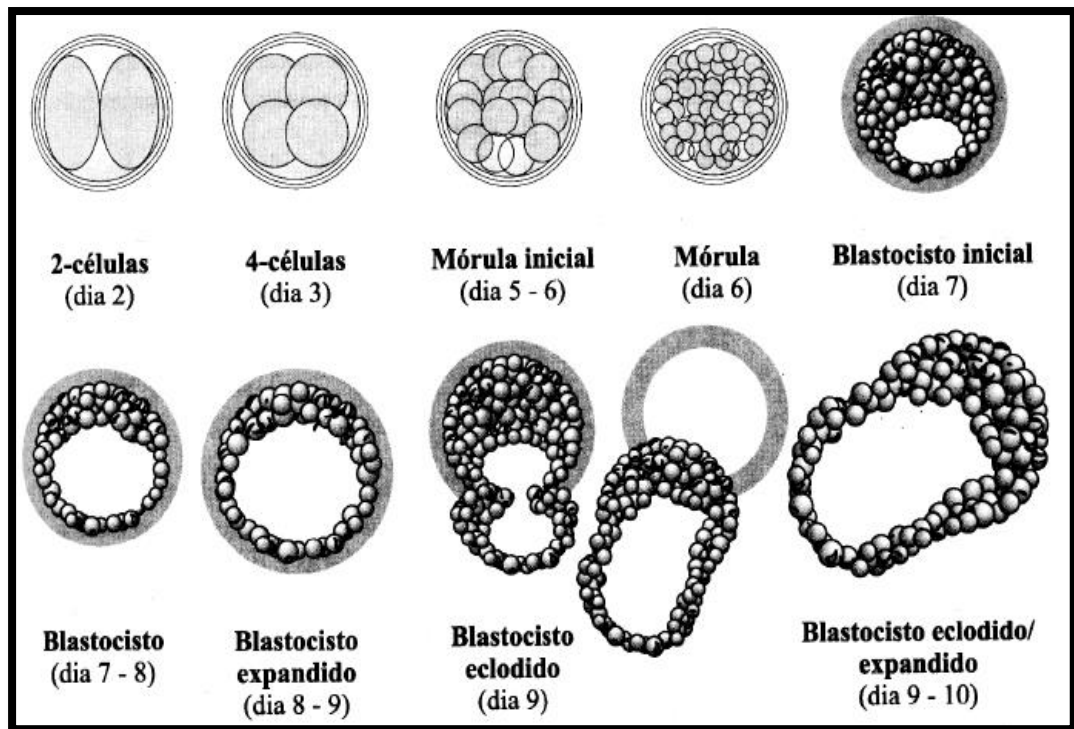


Figura 8 Estadios de desarrollo embrionario

Fuente: (PROSEGAN, 2009)

2.4 Colecta de Embriones Bovinos

Según Orellana, J. y Peralta, E. (2007), señalan que la colecta de embriones se realiza el día 15 del protocolo de superovulación o 7 días después de la primera Inseminación Artificial (I.A.) de la vaca donadora, mediante un lavado uterino transcervical.

La metodología empleada para la colecta de embriones, consiste en la introducción de un catéter Folley con ayuda de un mandril que le da la rigidez necesaria para el paso a través del cérvix, hasta alcanzar el cuerno uterino, el catéter avanza hasta 1/3 medio del cuerno (5-10 cm del cuerno); una vez fijado el catéter se retirará el mandril y se procederá a inflar el balón del catéter Folley (12 -15 ml de aire), dependiendo del tamaño del cuerno uterino (Palma G. , Recolección de los Embriones Bovinos , 2001).

El medio que se utiliza para el lavado uterino es el Buffer Fosfato Salino -PBS, adicionado 1 % de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado, para producir una corriente de arrastre (flushing) a través de los cuernos uterinos, el volumen del líquido varía de acuerdo a la dimensión del cuerno (250 ml del suero para cada cuerno). Una vez

terminado el lavado se repite la operación en el otro cuerno. El medio con los embriones es recolectado en filtros que permiten su separación a medida que fluye el medio de lavado, en recipientes de plástico especial. Para evitar una posible preñez de la vaca donante se debe aplicar una dosis de (2 ml) de PGF2 α , al finalizar el lavado (Orellana & Peralta, 2007).

2.4.1 Evaluación de embriones bovinos

Los embriones bovinos normalmente son evaluados en una caja Petri cuadrículada, con un estereomicroscopio con una ampliación de 50 a 100x, para ver el embrión y la zona pelúcida desde diferentes perspectivas. El diámetro del embrión oscila entre 150-190 μm ., mientras que la zona pelúcida presenta un diámetro de 12-15 μm . El embrión ideal debe ser esférico compacto y presentar tamaño, color y textura similar; el espacio perivitelino no debe presentar desechos celulares y presentar un color claro; la zona pelúcida no debe presentar una superficie uniforme sin agrietamientos (Bó & Mapletoft, 2013).

La evaluación morfológica de los embriones es uno de los factores más importantes en un programa de transferencia de embriones y considera los siguientes criterios:

2.4.2 Criterios de calidad embrionaria

- Forma esferoide.
- Simetría de los blastómeros.
- Apariencia clara y neta de los blastómeros.
- Tonalidad oscura y uniforme.
- Uniformidad de la membrana celular.
- Proporcionalidad entre el embrión y el espacio perivitelino.
- Integridad de la zona pelúcida.
- Ausencia de detritus celulares adheridos a la zona pelúcida.
- Compactación de los blastómeros entre sí.

Fuente: (Cabodevila & Torquati, 2001)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del área de investigación

3.1.1 Ubicación política

El ensayo en campo y laboratorio se realizó en la Carrera de Ingeniería Agropecuarias IASA II – Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE:

Ubicación referencial: Hacienda. Zoila Luz km 24 vía Santo Domingo-Quevedo.

Parroquia: Luz de América

Cantón: Santo Domingo de los Colorados.

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas.

3.1.2 Ubicación geografía

La Hacienda. Zoila Luz se encuentra a una altitud de 270 m.s.n.m. en las coordenadas UTM 9954241 Este, 688477 Norte.

3.1.3 Ubicación ecología

Zona de vida: Bosque Húmedo Tropical (Bht) (Holdridge, 1987).

Formación Ecológica: Bosque Siempreverde Piemontano (Sierra, 1999)

Características climáticas

Temperatura media anual: 25.7 °C

Precipitación media anual: 1661 mm/año

Heliofanía media anual: 660 h/luz/año

Humedad relativa: 84%

3.2 Materiales

3.2.1 Material experimental

Hembras bovinas (donantes) en estado reproductivo para superovular (no gestante) de la raza Girholando

3.2.2 Material complementario

3.2.2.1 Sincronización de celo

- Hormonas utilizadas
 - Progesterona
 - Benzoato de Estradiol
 - Prostaglandina
 - GnRH
- Dispositivo intravaginal de progesterona
- Aplicador de implantes vaginales

3.2.2.2 Superovulación

- Hormonas utilizadas
 - FSH-p
 - eCG

3.2.2.3 Inseminación artificial

- Pajuelas de semen importado de raza Holstein, Gyr y Girholando
- Pistola de Inseminación artificial
- Catéteres de Inseminación artificial
- Chemise
- Tijera cortadora de pajuelas
- Termómetro
- Guantes obstétricos desechables
- Termo descongelador de semen

3.2.2.4 Lavado uterino y colecta de embriones

- Anestésico local (Clorhidrato de lidocaína al 2%)
- Flunixin meglumine base
- Catéter Folley de dos vías # 16 o 18
- Sondas adaptables a catéter Folley
- Mandril de acero inoxidable

- Dilatador de cérvix
- Suero fisiológico fetal bovino (PBS + 1% de SFB)
- Filtros con poros milimétricos, para colecta de embriones
- Agujas hipodérmicas de 18G y 21G
- Jeringuillas desechables de 5, 20 y 50 ml

3.2.2.5 Evaluación de embriones

- Cajas Petri cuadrículadas
- Micropipetas para embriones
- Puntas de micropipetas 10µl
- Cajas Petri de 4 pocillos
- Estéreo microscopio
- Baño maría
- Placa térmica
- Cámara fotográfica
- Medio de conservación para embriones (Holding)
- Jeringa de 20 ml
- Suero fisiológico fetal bovino (PBS + 1% de SFB) como medio de lavado

3.2.2.6 Crio preservación de embriones

- Congelador de embriones con marcaje 20 a -40 °C. FREEZE CONTROL®; modelo CL-5500 SYSMTEM
- Medio de cultivo de crio-preservación (Etilenglicol)
- Medio de conservación para embriones (Holding)
- Pajuelas de plástico para embriones de 0.25 ml
- Sellador manual de pajuela
- Termo con nitrógeno líquido 20/20; marca I.M.V
- Marcador permanente para rotular

3.2.2.7 Esterilización, higiene y limpieza

- Estufa de esterilización

- Toallitas desinfectantes
- Cepillos
- Escurreidor
- Papel de filtro
- Jabón neutro
- Detergente fenólico
- Alcohol etílico de 70°

3.2.2.8 Equipos extra

- Deshumificador marca EXCELL modelo: MDFE65AN1; UPS Estabiliza y mantiene energía modelo PS5490.
- Overol
- Botas
- Mandil

3.3 Métodos

En la presente investigación se realizó la sincronización de celos, superovulación, inseminación artificial, lavado uterino, colecta de los embriones y evaluación de la respuesta superovulatoria a través de parámetros como la calidad y cantidad de embriones colectados. Se utilizaron ocho vacas donantes las cuales fueron previamente preparadas (nutrición, sanidad y manejo) 45 días antes de la aplicación de los protocolos hormonales de superovulación.

La segunda repetición se llevó a cabo dos meses después de realizar la primera sincronización y colecta de embriones, para la segunda fase, se realizó el cruce de los tratamientos entre las unidades experimentales. Los embriones colectados, que presentaron las mejores características fueron sometidos a un proceso de crio-preservación.

3.3.1 Diseño Experimental

3.3.1.1 Factores

Los factores de estudio fueron dos protocolos hormonales para superovulación (FSH-p y eCG) en el ganado bovino.

3.3.1.2 Tratamientos

Para el estudio se aplicó los siguientes tratamientos (ver figura 14 y 15):

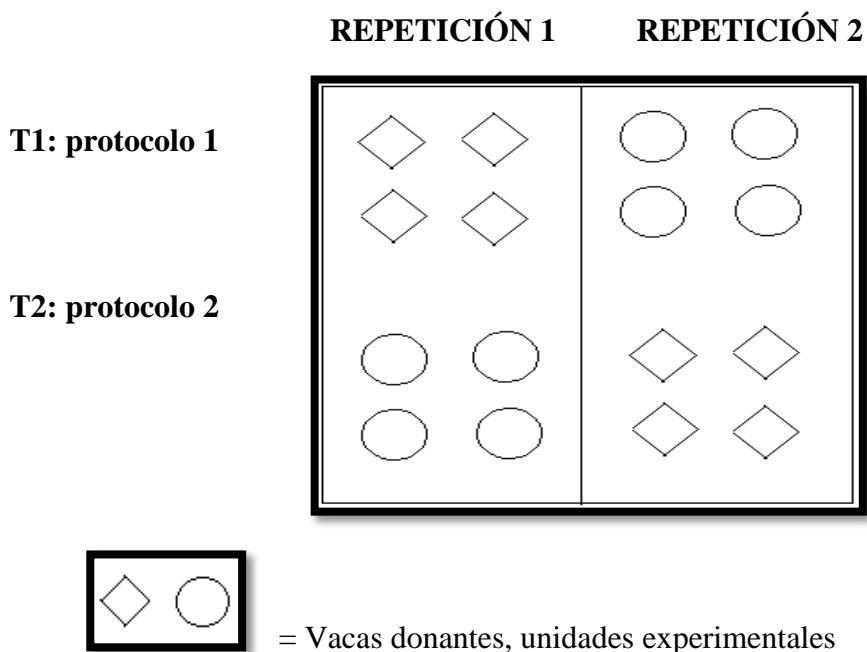
T1: protocolo 1 (FSH-p)

T2: protocolo 2 (eCG)

Cada tratamiento consta de cuatro unidades experimentales (vacas donantes).

3.3.1.3 Esquema del diseño experimental

Figura 9 Modelo de esquema para los tratamientos 1 y 2



3.3.1.4 Análisis estadístico

En la presente investigación se utilizó cuatro vacas donantes (entre vacas vientres y vacas primerizas), para cada tratamiento de superovulación T1: protocolo 1 (FSH-p) y T2: protocolo 2 (eCG), por lo que se manejó cuatro unidades

experimentales con dos repeticiones por cada tratamiento. La segunda repetición se llevó a cabo dos meses después, cruzando los tratamientos entre las unidades experimentales.

El diseño experimental fue evaluado con una Prueba de Comparación de Medias con muestras dependientes, con la finalidad de que, al culminar el ensayo los dos tratamientos fueron aplicados a la misma unidad experimental. El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat versión 2015. Prueba Chi cuadrado (X^2), para establecer si existen o no diferencias significativas por efectos de los tratamientos en las respuestas de la superovulación, en cuanto al estadio de desarrollo y calidad embrionaria.

3.3.1.5 Variables a medir

3.3.1.5.1 Número de embriones

Tras la colecta de embriones de las vacas donantes, se realizó el conteo del número de embriones obtenidos por unidad experimental y tratamiento.

3.3.1.5.2 Grados de calidad embrionaria

Este proceso se basa en la observación microscópica con una lupa estereoscópica (0,7 – 6,4x) de la morfología de los embriones. De acuerdo a las normas International Embryo Transfer Society (IETS), la calidad de embriones se basa en la integridad morfológica. Los códigos de calidad varían del 1 a 4 (Stingfellow & Siedel, 2000).

Excelente o Bueno (I): el embrión no presenta defectos visibles y es consistente en la etapa de desarrollo. La masa embrionaria es intacta, uniforme en tamaño color y densidad, las irregularidades deben ser menores al 85%. La zona pelúcida debe ser completamente lisa sin irregularidades. Los embriones de Grado I se caracterizan por sobrevivir al procesos de congelación/descongelación son llamados “embriones congelables”, son adecuados para el comercio internacional (Bó & Mapletoft, 2013).

Regular (II): El embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celular (Stingfellow &

Siedel, 2000). La masa embrionaria presenta irregularidades moderadas en cuanto a tamaño, color y densidad de las células individuales, al menos el 50% deben estar intacta. Los embriones de Grado II son denominados como “transferibles” debido a que la tasa de preñez es alta, si los embriones son transferidos en fresco. La supervivencia al proceso de congelación/descongelación es menor que los embriones de Grado I (Bó & Mapletoft, 2013).

Malo (III): El embrión posee varias irregularidades: detritus celulares, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida, al menos el 25% de la masa embrionaria debe estar intacta. Esta categoría es considerada como no transferible o criopreservable debido a que no sobrevive al proceso de congelación/descongelación (Bó & Mapletoft, 2013).

Muerto o Degenerado: El embrión posee muchas irregularidades: los correspondientes al grado III más desarrollo retardado, sería ruptura de la zona pelúcida (el embrión puede encontrarse parcialmente fuera de ella), su forma es muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o vacuolización de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y la clara degeneración. Esta categoría es considerada como no transferible o criopreservable (Stingfellow & Siedel, 2000).

Calidad embrionaria



Figura 11 Embriones excelentes o buenos (I)

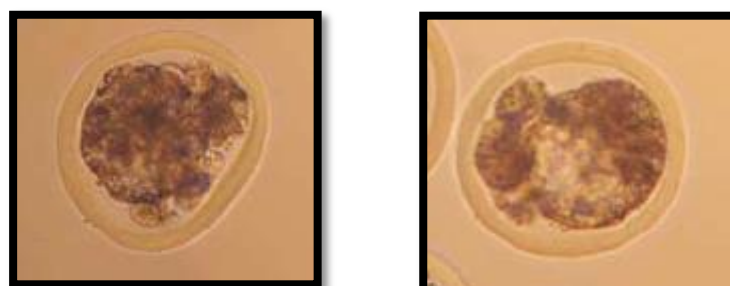


Figura 10 Embriones regulares (II)

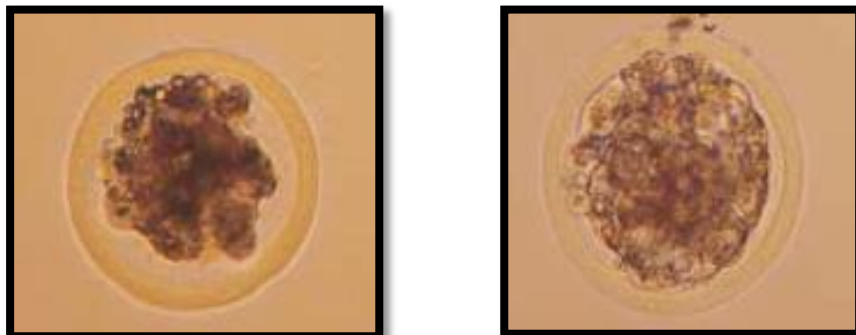


Figura 13 Embriones Malos (III)

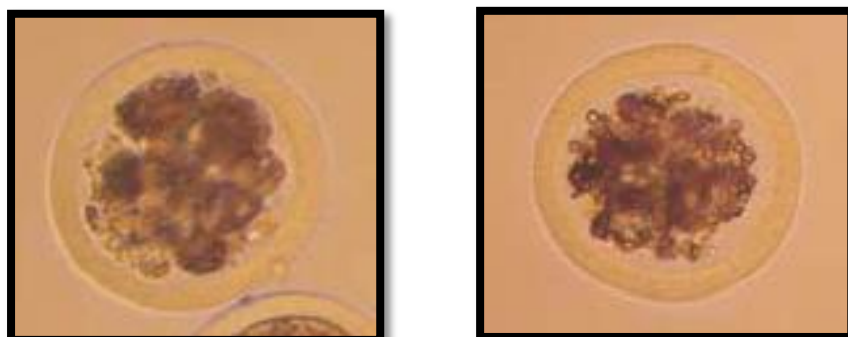


Figura 12 Embriones muertos o degenerándose (II)

Fuente: (Becaluba, 2007)

3.3.1.5.3 Estadio de desarrollo embrionario

Mediante una observación microscópica de la morfología que presentan los embriones colectados y de acuerdo a las normas (IETS), se clasificó los embriones en función de su estadio de desarrollo de manera numérica (Stingfellow & Siedel, 2000).

Tabla 1
Estadio de desarrollo embrionario

Código	Estado	No. De
De estado		células
		(días)
1	No fecundado	
2	2 a 12 células	2-4
3	Mórula temprana	5
4	Mórula	6
5	Blastocisto temprano	7
6	Blastocisto	7
7	Blastocisto expandido	8
8	Blastocisto eclosionado	9
9	Blastocisto eclosionado expandido	

Fuente: (IETS, 2000)

3.3.2 Métodos específicos de manejo del experimento

3.3.2.1 Capacitación de reconocimiento de anatomía y fisiología del tracto reproductivo

Se realizó un entrenamiento previo en el útero de animales de matadero y vacas de descarte, para proporcionar los conocimientos fundamentales de las estructuras anatómicas del tracto reproductivo de la hembra bovina y además realizar una adecuada técnica de lavado, colecta y evaluación de embriones.

Con el útero de animales de matadero se realizó una exploración del aparato reproductor, reconocimiento de las diferentes estructuras anatómicas del tracto reproductor y las etapas del ciclo sexual mediante palpación y evaluación ecográfica; además se realizó una práctica de punción folicular, para la búsqueda y reconocimiento de ovocitos.

En las vacas de descarte se realizó la evaluación de los diferentes órganos del aparato reproductivo mediante palpación y ecografía; así como un simulacro de lavado uterino.

3.3.2.2 Preparación de hembras bovinas donantes

Estas vacas presentan un estado de lactancia pero no gestantes. El estado reproductivo de las vacas donantes, fue evaluado mediante un examen ginecológico con el uso de un ecógrafo con sonda transrectal.

Se mantuvo registros individuales de cada vaca donante en cuanto a parámetros productivos (peso), presencia de celos, estado reproductivo, manejo sanitario etc. La alimentación se basa en niveles adecuados de proteína, con pasturas frescas bajo un sistema de rotación diaria y el suministro de agua a voluntad (*at libitum*). Se aplicó, un programa de Manejo Sanitario (vacunaciones, desparasitaciones interna y externa, administración de vitaminas) adecuado.

Transcurrido los 45 días del período de manejo de las donantes

Se procedió a realizar la sincronización de celos y la superovulación a las donantes con los siguientes protocolos:

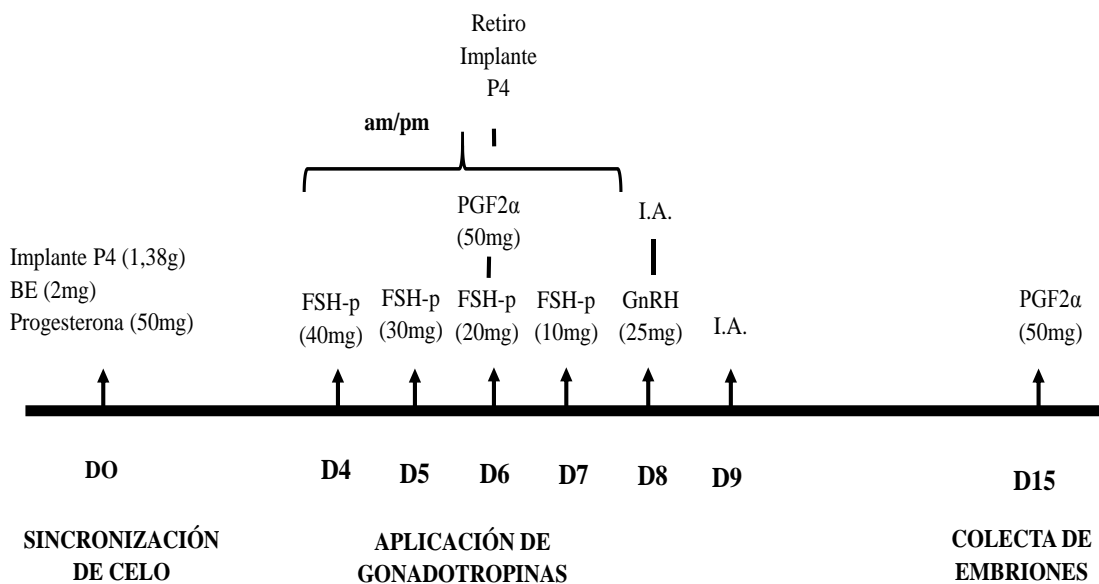


Figura 14 Tratamiento 1 (con FSHp)

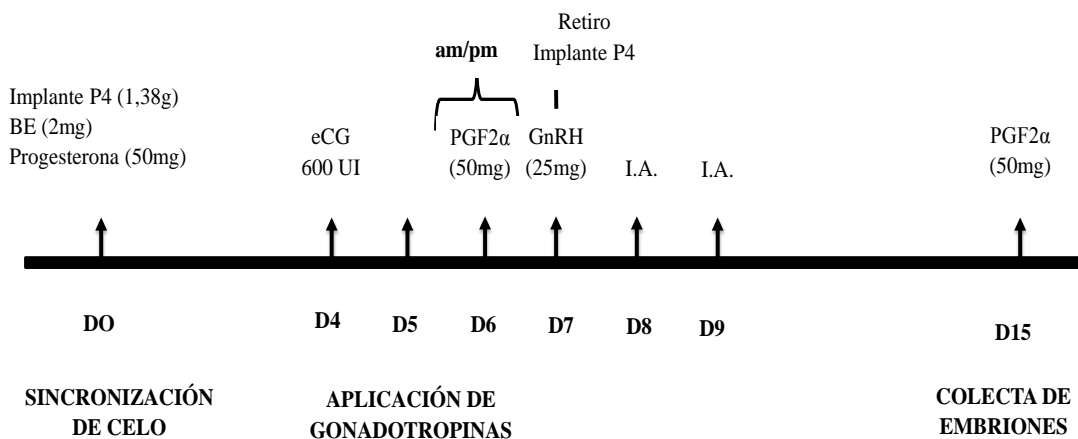


Figura 15 Tratamiento 2 (con eCG)

3.3.2.3 Procedimiento para la colecta de embriones

La colecta de embriones se realizó el día 7 post-inseminación, para la preparación de la vaca donante primero se evacuó las fecas, se precisa la posición y dimensiones del útero y se realiza una limpieza y desinfección (alcohol 70%) de la región perianal, luego se efectúa un recorte de pelo en el área de la tercera vértebra sacra y la primera coxígea, para aplicar una inyección epidural de 3 – 5 ml de clorhidrato de lidocaína al 2% (anestésico vía epidural) permitiendo la relajación de la cola y 5 ml de flunixin base (antiespasmódico), después de la aplicación es importantes dejar tranquilo al animal, durante un periodo de 10-20 minutos.

En el proceso del lavado de embriones se utiliza el sistema de circuito cerrado con flujo continuo, empleando un catéter de Folley de dos vías (16 – 18 G), el mismo que es lubricado con la solución de lavaje PBS + 1% de SFB (suero fisiológico fetal bovino), al mismo tiempo permite eliminar impurezas.

El catéter Folley es introducido con ayuda de un mandril, para atravesar el cérvix hasta alcanzar el cuerno uterino, el catéter avanza hasta 1/3 medio del cuerno (5-10 cm del cuerno); una vez fijado el catéter se retira el mandril y se procede a inflar “balón” del catéter Folley (12-15 ml de aire) dependiendo del diámetro del útero.

El medio de lavado ingresa a través de fracciones de flujo y/o chorro continuo en la otra vía del catéter Folley, el volumen del medio de lavado varía de acuerdo al tamaño del cuerno (500 ml para cada cuerno), el medio de lavado debe estar a una temperatura de 35° y 37°C, una vez que ingresa el medio de lavado se realiza masajes leves. El retorno del medio, se lo recoge en filtros provisto de una malla de acero inoxidable con poros de 60 a 90 micras. Los recipientes estarán a temperatura ambiente y protegidos de la luz solar directa. Se estima recuperar el suero aplicado sobre el 90%. Una vez terminado el lavado, se repetirá la operación en el otro cuerno. Al finalizar el lavado de la vaca donante, se administra una dosis (2 ml) de PGF2 α , con la finalidad de producir luteólisis con la consecuente eliminación de los embriones que hubiesen quedado.

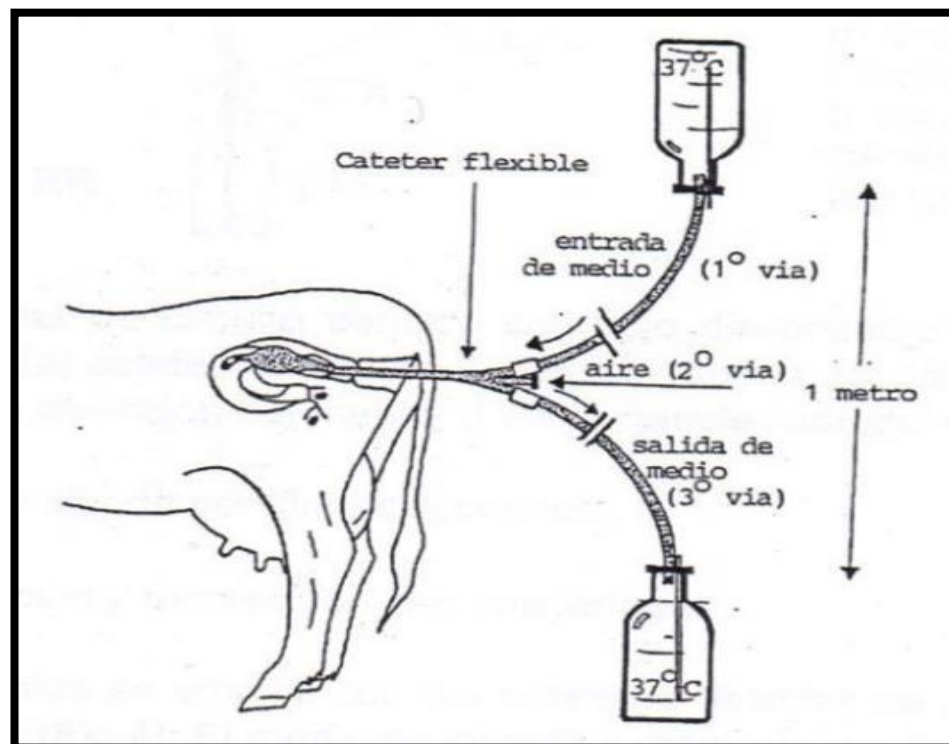


Figura 16 Esquema del circuito cerrado con flujo continuo

Fuente: (Palma, 2001)

3.3.2.4 Procedimiento para la búsqueda de embriones

Para el aislamiento de los embriones de los grandes volúmenes de medio se utilizó filtros estériles con malla de acero inoxidable de 60-90 μm de diámetro de poro (embrión 150 μm diámetro).

El líquido que contiene a los embriones (20-25 ml) se vertió en cajas Petri cuadradas estériles. La búsqueda se realiza en forma de guarda griega, en sentido de las abscisas como de las ordenadas; los embriones encontrados se depositan en cajas Petri con cuatro pocillos ovalados, que contiene medio enriquecido de suero fetal; esta operación se repitió entre 4 a 5 veces a fin de “lavar” los embriones.

3.3.2.5 La evaluación de la calidad de los embriones

En base a una observación caracterizada no invasiva se determina los estadios de mórula y blastocisto, estableciendo las particularidades de tamaño, forma, apariencia, simetría de las células embrionarias. La calidad del embrión permitirá el éxito de la implantación en la transferencia y/o crio preservación.

3.3.2.6 Congelación de los embriones

Los embriones colectados que presentaron grado de calidad I y II fueron sometidos a un proceso de crio-preservación o congelación. Los embriones colectados, se los envasaron en pajuelas 0,25 ml, succionando primero, una columna de medio de crio-preservación (etilenglicol), una pequeña columna de aire, luego el embrión con medio, después otra porción de aire y finalmente una columna del medio, para ser sellados.

La congelación de los embriones se la realiza utilizando el equipo Freeze Control en Nitrógeno líquido. Entre los -4 y -7 °C, se efectúa el “seedeng” para evitar la cristalización del embrión y que produzca lesiones en él. La congelación se la lleva hasta temperaturas de -32 °C durante un periodo de 60 minutos; luego los embriones son sumergidos en nitrógeno líquido a -196 °C, depositados en “goblets” rotulados en el termo banco en donde se mantendrán almacenados hasta ser transferidos en receptoras



Figura 17 Diseño del llenado de la pajuela con un embrión congelado

Fuente: (Ávila, 2013)

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Número de embriones colectados por cada unidad experimental y tratamiento.

La colecta de los embriones se realizó 7 días post-inseminación, mediante el método no quirúrgico de recolección utilizando el método de lavado uterino mediante un sistema de circuito cerrado con flujo continuo, tras la colecta de embriones se realizó el conteo del número de embriones obtenidos por cada vaca donante y tratamiento de superovulación.

Mediante un análisis descriptivo del número de embriones totales obtenidos por unidad experimental (ver tabla 2), se determinó un grado de superioridad en el tratamiento superovulatorio con FSH-p con el cual se obtuvo un total de 43 embriones, superando en un 45,76% (ver figura 18) al tratamiento con eCG con el cual se obtuvo 16 embriones.

Tabla 2
Número de embriones por cada unidad experimental

Donante	Tratamiento		
	FSH-p	eCG	
172	0	3	
169	4	0	
180	6	0	
11927	20	1	
94	4	7	
114	5	5	
92	0	0	
178	4	0	
Total (n)	43	16	59
Total (%)	72,88	27,12	100

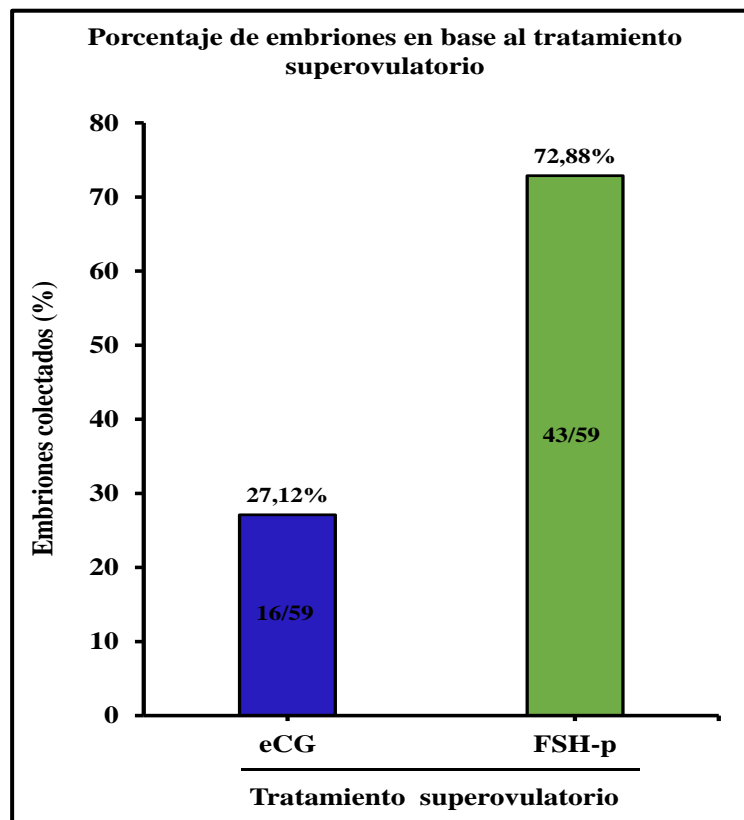


Figura 18 Embriones colectados en base al tratamiento superovulatorio

Para establecer diferencia entre los dos tratamientos de superovulación se realizó un ANOVA el cual evidenció al 95% de nivel de confianza que no existe diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,1636$) en cuanto a la media de embriones colectados. Con la prueba paramétrica de LSD Fisher al 95% de confianza, se determinó que no existen diferencias entre los tratamientos.

Tabla 3
Respuesta superovulatoria (media \pm EE) en vacas donantes tratadas con dos protocolos de superovulación

Tratamiento	Nº Embriones	
FSH-p	1,89 \pm 0,45	A
eCG	0,95 \pm 0,45	A

p: 0.1636

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

Test: LSD Fisher

4.2 Grados de calidad embrionaria

Los embriones colectados, fue evaluado su morfología, mediante un microscopio provisto de una lupa estereoscópica (0,7 – 6,4x). De acuerdo a las normas International Embryo Transfer Society (IETS), la calidad de embriones se basa en la integridad morfológica, se considera un embrión ideal cuyos blastómeros presenten un tamaño similar, color y textura uniformes, el espacio perivitelino no debe contener desechos celulares y la zona pelúcida debe estar completamente intacta. Los códigos de calidad varían del I a IV.

Para establecer diferencias entre los protocolo de superovulación en base a los grados de calidad embrionaria se realizó un análisis de datos con tablas de contingencia, en la que se determinó que al 95% de nivel de confianza, existe diferencia entre los tratamientos (*chi-cuadrado*: 7.97, p : 0.0467) (ver tabla 4). En la figura 19 se pudo determinar que el tratamiento superovulatorio con FSH-p alcanzó la mayor producción de embriones de buena calidad que corresponde Grado I (34.88%) y II (39.53%) en comparación con el tratamiento que utiliza eCG; en

cuanto a los embriones de mala calidad que corresponde al Grado III y IV (31,35%) se obtuvo el mayor porcentaje con el tratamiento con eCG.

Tabla 4
Grados de calidad embrionaria obtenidos con dos protocolos de superovulación

Calidad Embrionaria	Tratamiento		Total
	eCG	FSH-p	
Excelente	4 25,00%	15 34,88%	19 32,20%
Regular	2 12,50%	17 39,53%	19 32,20%
Malo	5 31,25%	7 16,28%	12 20,34%
Muerto o Degenerándose	5 31,25%	4 9,30%	9 15,25%
Total (n)	16	43	59
Total	100,00%	100,00%	100,00%

p: 0,0467

Chi-cuadrado: 7,97

gl: 3

Test: Chi Cuadrado Pearson

Independientemente del protocolo de superovulación utilizado en la investigación del 100% de embriones colectados, el 64,40% corresponde a los embriones de grado I y II mientras que el grado III y IV presenta un porcentaje de 20,34 y 15,35% respectivamente (ver tabla 4).

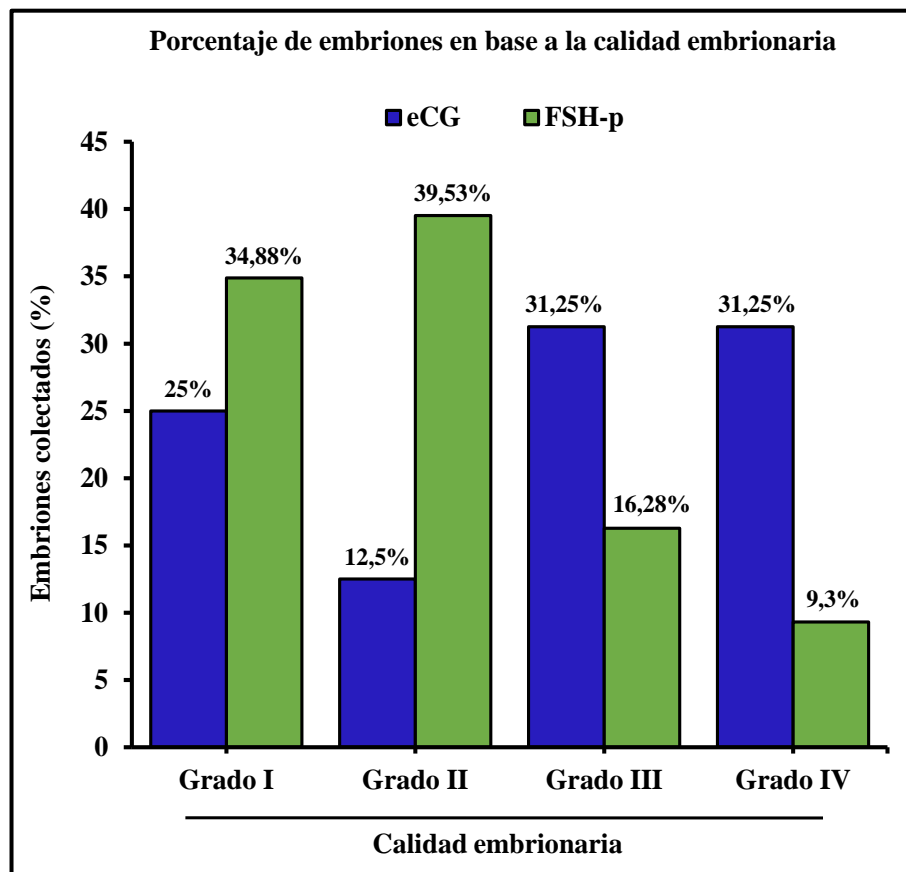


Figura 19 Porcentaje de embriones colectados para cada uno de los grados de calidad embrionaria

En la figura 20 se observa que del 100% de embriones colectados para cada grado de calidad, el mayor porcentaje pertenece al grado I, II y III de calidad con 78,95, 89,47 y 58,33% respectivamente, obtenidos con el tratamiento FSH-p; con respecto al grado IV de calidad el mayor porcentaje (55,56%) se obtuvo con el tratamiento superovulatorio con eCG.

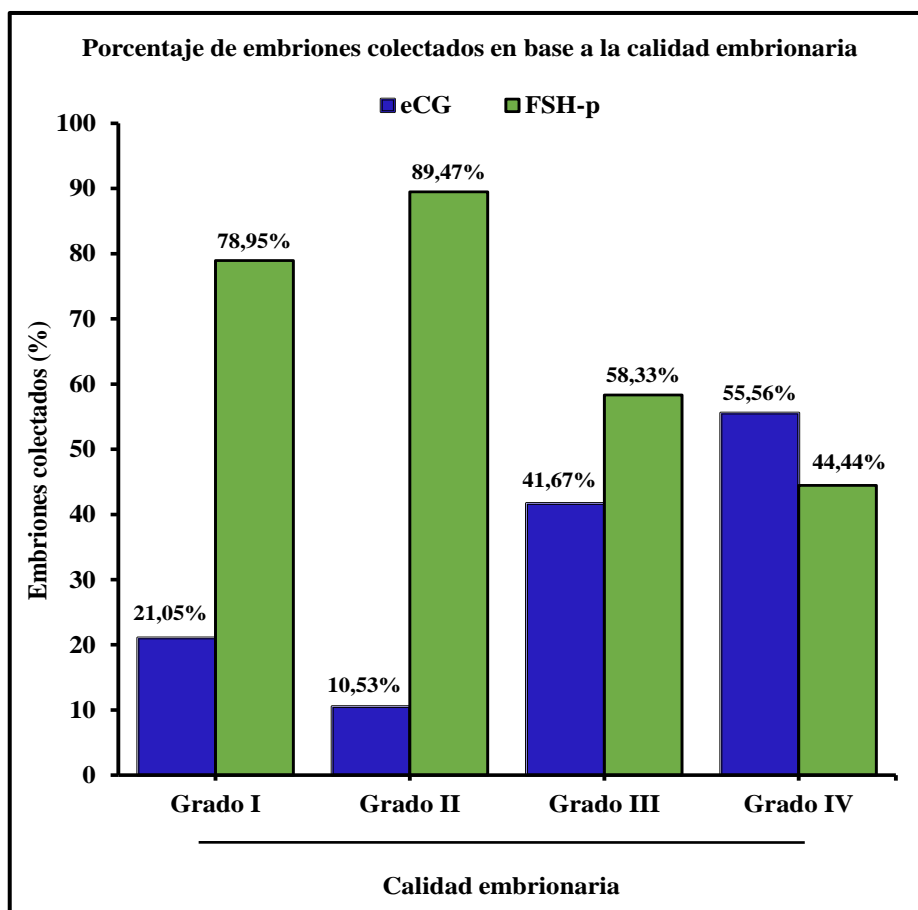


Figura 20 Respuesta superovulatoria en base a los grados de calidad embrionaria (%) de donantes tratadas con dos protocolo de superovulación

4.3 Estadio de desarrollo embrionario

Mediante una evaluación morfológica de los embriones colectados se realizó una clasificación de acuerdo a su estadio de desarrollo. El código para el estadio de desarrollo es numérico y va desde (1) que corresponde a un ovocito no fertilizado, hasta (9) blastocisto eclosionado.

Para establecer diferencias entre los protocolos de superovulación en base a los estadios de desarrollo embrionario se realizó un análisis de datos con tablas de contingencia, en el cual se determinó, con un 95% de nivel de confianza, que existe diferencia entre los tratamientos (*chi-cuadrado*: 16.30, *p*: 0.0225).

Los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento superovulatorio con FSH-p en los estadios de desarrollo de blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido con 16.28, 27.91 y 2.33% respectivamente (ver figura 21), frente al tratamiento con eCG. Los dos tratamientos superovulatorios produjeron un porcentaje semejante de embriones en estado de mórula con 37,00% (ver tabla 5).

Tabla 5
Estado de desarrollo embrionario obtenidos con dos protocolos de superovulación

Desarrollo embrionario	Protocolo		Total
	eCG	FSH-p	
No fecundado	0 0,00%	1 2,33%	1 1,69%
2 a 12 células	6 37,50%	3 6,98%	9 15,25%
Mórula temprana	2 12,50%	3 6,98%	5 8,47%
Mórula	6 37,50%	16 37,21%	22 37,29%
Blastocisto temprano	1 6,25	7 16,28	8 13,56
Blastocisto	0 0,00	12 27,91	12 20,34
Blastocisto expandido	0 0,00	1 2,33	1 1,69
Blastocisto eclosionado	1 6,25	0 0,00	1 1,69
Expandido			
Total (n)	16	43	59
Total	100,00%	100,00%	100,00%

p: 0,0225
Chi-cuadrado: 16,30
gl: 7
Test: Chi Cuadrado Pearson

Independientemente del protocolo de superovulación utilizado en la investigación del 100% de embriones colectados, el mayor porcentaje se obtuvo en el estadio de mórula (37,29%) y blastocisto (20,34%) (ver tabla 5).

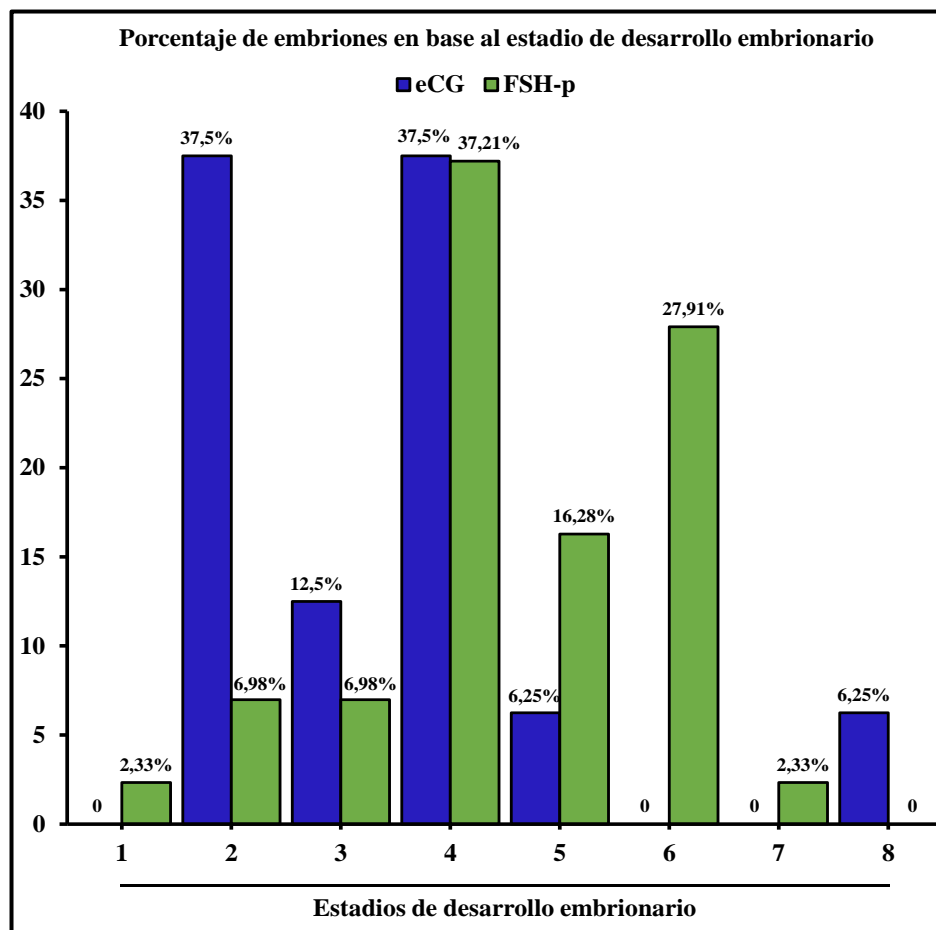


Figura 21 Porcentaje de embriones colectados para cada uno de los estadios de desarrollo embrionario obtenidos con dos protocolos de superovulación.

4.4 Número de cuerpos lúteos vs embriones colectados

La colecta de los embriones se realizó 7 días post-inseminación, momento en el que se realizó un control ginecológico con la ayuda de un ecógrafo con el que se determinó el número de cuerpos lúteos presentes en cada ovario; este análisis permite estimar el número de embriones a recuperar.

Mediante un análisis descriptivo del número de cuerpos lúteos totales obtenidos por unidad experimental (ver tabla 6) se estableció que, con el tratamiento

de superovulación FSH-p se obtuvo 67 cuerpos lúteos, superando en 14,52% al tratamiento con eCG, mismo que arrojó 50 cuerpos lúteos; es decir que existe una mejor respuesta ovárica, reflejada en el número de ovulaciones (cuerpo lúteo) con el protocolo de superovulación FSH-p

Tabla 6
Relación entre número de cuerpos lúteos y embriones colectados por tratamiento superovulatorio

Donante	Protocolo			
	eCG		FSH-p	
	Cuerpo lúteo	Embriones colectados	Cuerpo lúteo	Embriones colectados
172	5	3	6	0
169	8	0	10	4
180	5	0	10	6
11927	5	1	13	20
94	5	7	7	4
114	8	5	7	5
92	8	0	7	0
178	6	0	7	4
TOTAL (n)	50	16	67	43
TOTAL (%)	42,74%	13,67%	57,26%	36,75%

En la figura 22, podemos establecer que el número de embriones colectados por cada vaca donante es inferior al número de cuerpos lúteos presentes en el examen ginecológico, puesto que por cada ovulación se forma un cuerpo lúteo, lo que concuerda con (Alberio R. 1991) que en las colectas de embriones, estos pueden ser recuperados hasta el 60% de ellos.

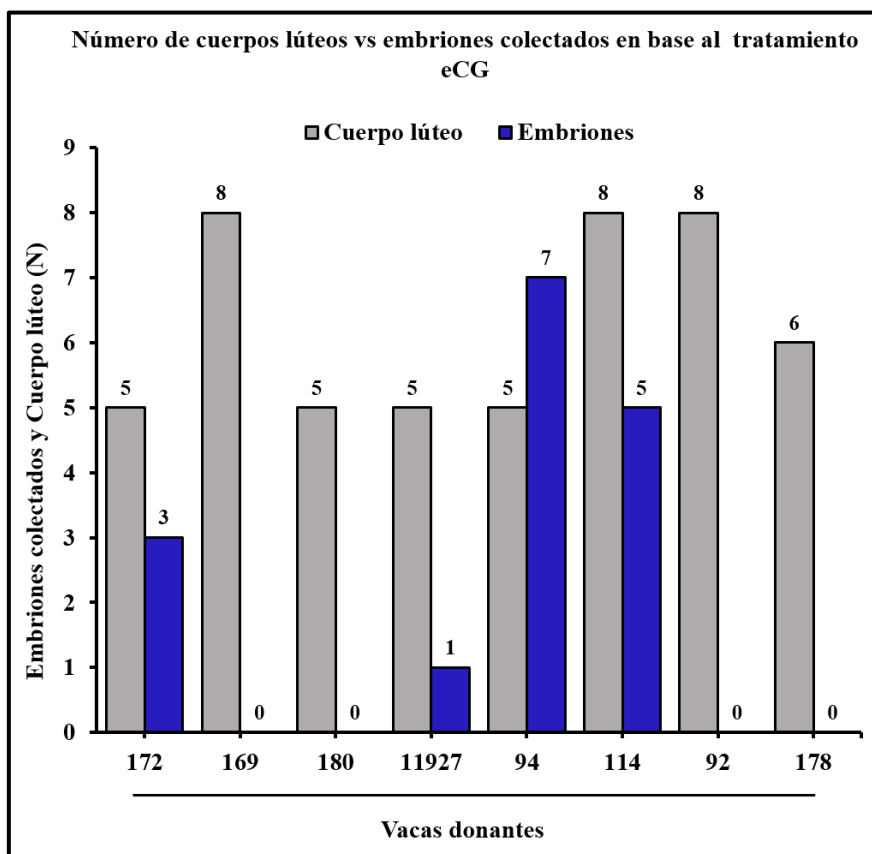


Figura 22 Relación entre el número de cuerpos lúteos y embriones colectados por cada vaca donante, obtenidos por el protocolo con eCG

En la figura 23 se establece que el número de embriones colectados por cada vaca donante es inferior al número de cuerpos lúteos, en la mayoría de los casos; aunque la donante 11927 presentó superioridad en el número de embriones colectados con relación al número de cuerpos lúteos, esto se debe a la experiencia que presenta el operador en el momento de realizar la ecografía y determinar las estructuras presentes, al igual que el poder de resolución del ecógrafo.

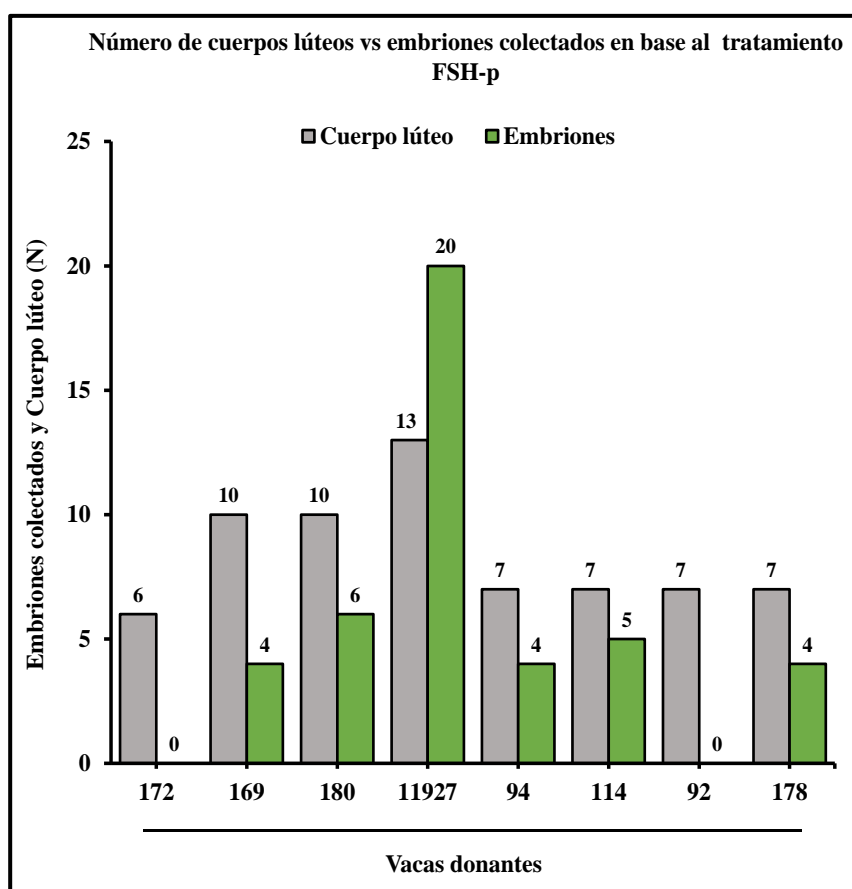


Figura 23 Relación entre el número de cuerpos lúteos y embriones colectados por cada vaca donante, obtenidos por el protocolo con FSH-p

4.5 Crecimiento folicular

Para el crecimiento folicular se realizó el registro del diámetro de los folículos presentes en los ovarios, mediante un chequeo ginecológico con la ayuda de un ecógrafo. El examen ecográfico se realizó desde el día 0 que corresponde a la sincronización de celo y durante la aplicación de las gonadotropinas (FSH-p – eCG).

Tabla 7
Media \pm desviación estándar del diámetro de los folículos durante la aplicación de los protocolos superovulatorios

Días	Protocolo	
	eCG	FSH-p
	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
D0	4,26 \pm 1,79	4,99 \pm 1,33
D1	5,08 \pm 1,58	5,72 \pm 1,47
D4	5,94 \pm 1,01	6,31 \pm 1,54
D5	6,56 \pm 1,16	7,12 \pm 1,49
D6	7,23 \pm 0,77	8,21 \pm 1,45
D7	8,81 \pm 1,24	8,99 \pm 1,30

En la figura 24 se puede observar el promedio de crecimiento folicular de los dos tratamientos de superovulación, se fue incrementando de manera paulatinamente. En el día 4 de tratamiento al aplicar las gonadotropinas; los folículos del tratamiento con FSH-p presentan un diámetro de 6,31 mm; mientras que los folículos del tratamiento eCG presentan un diámetro de 5,94 mm; al día 7 para ambos tratamiento presentaron diámetro folicular similares, esto es de 8,99 y 8,81 mm respectivamente (ver figura 24).

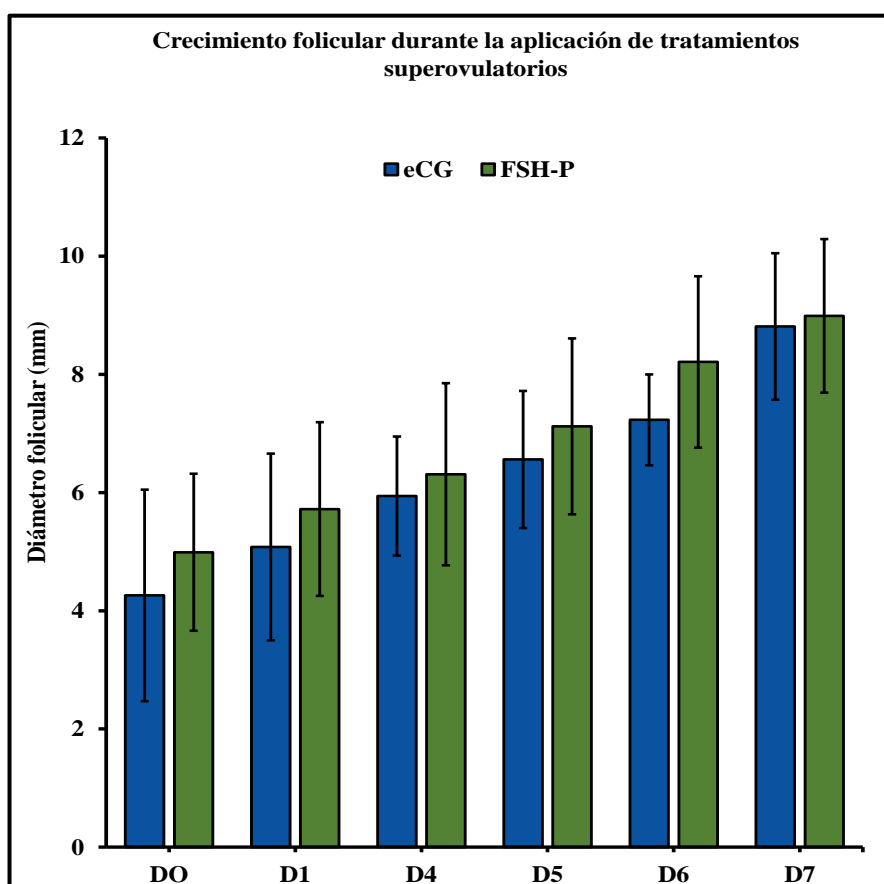


Figura 24 Crecimiento folicular durante la aplicación de gonadotropinas (eCG -FSH-p) en un protocolo de superovulación

4.6 Discusión

En el presente proyecto de investigación se evaluó dos protocolos hormonales de superovulación para determinar la cantidad, grados de calidad y estadios de desarrollo embrionario a en vacas Girolando.

En cuanto al análisis de cantidad embrionaria, se determinó que el número total de embriones es mayor cuando se utiliza FSH-p (43 embriones) habiendo una diferencia del 45.76% frente al protocolo con eCG (16 embriones). Los resultados obtenidos en la investigación son superiores a los de Cordovez (2010) quién obtuvo 34 embriones utilizando la FSH-p, con el mismo número de donantes.

La variabilidad que presenta la repuesta superovulatoria puede deberse a: factores relacionados con el animal; historia reproductiva, estado nutricional, edad de la donante, sanidad y factores relacionados al tratamiento superovulatorio como: estructuras presentes en los ovarios al inicio del tratamiento, tipo de gonadotropina utilizada, relación de FSH y LH de los preparados comerciales, duración de los tratamientos, vía de administración de las gonadotropinas, repetición de tratamientos superovulatorios (Olivera, 2014).

De acuerdo a los grados de calidad embrionaria, el tratamiento superovulatorio con FSH-p produjo la mayor cantidad de embriones de grado I (34.88%) y II (39.53%) en comparación con el tratamiento que utiliza eCG; mientras que el tratamiento con eCG se produjeron más embriones de mala calidad correspondientes al Grado III y IV (31,35%), estos resultados superan los de Mejía y Vásquez (2002) quienes reportaron el 64.7% de sus embriones en Grado I y II utilizando FSH-p ya que en la presente investigación se obtuvo 74.41% de embriones en Grado I y II.

De los 59 embriones colectados con los dos tratamientos superovulatorios, el 64,40% corresponde a los embriones de grado I y II; mientras que; los de grado III y IV presenta un porcentaje de 20,34 y 15,35% respectivamente, según el estudio realizado por Bó & Mapletoft (2013) los embriones de grado I son considerados congelables, pues sobreviven al procesos de congelacion/descongelación y las tasas de preñez son altas, mientas que los embriones de grado II de calidad, la tasa de preñez mas altas se obtiene cuando son tranferidos en fresco.

En el presente estudio se determinó que con el tratamiento FSH-p los estadios embrionarios avanzados (blastocisto, blastocisto expandido y blastocisto eclosionado) representaron el 30,24% del total de embriones colectados, frente al 53,49 % de mórulas y blastocisto temprano, es decir que los resultados obtenidos en la investigación son inferiores con respecto a aquella investigación realizada por Fonseca, Silva Filho, Pinto Neto, & Palhares (2001) quienes reportan que existe una

predominancia de los estadios embrionarios avanzados (blastocisto, blastocisto expandido y blastocisto eclosionado) representaron el 80% del total de estructuras, frente al 20% de las mórulas y blastocistos tempranos, utilizando la FSH-p.

Al analizar los datos de la tabla 7 se observa que los embriones obtenidos en la investigación presentan diferentes estadios de desarrollo en un mismo lavado, este fenómeno se debe a que las vacas donantes fueron inseminadas tres veces con intervalos de 10 horas. Palma (2001) afirma que la liberación de ovocitos en hembras bovinas superovuladas, no se realiza de manera simultánea, sino gradualmente. La ovulación en vacas donantes empiezan 24 horas después del pico de LH prolongándose hasta 33 horas después del mismo, por lo tanto la fecundación y desarrollo de los ovocitos no se realiza en el mismo tiempo y de manera sincrónica.

Independientemente del protocolo de superovulación utilizado en la investigación se obtuvo el mayor porcentaje de embriones en los estadios de mórula (37,29%), blastocisto temprano (13,56%) y blastocisto (20,34%), El efecto que puede llegar a tener el estadio de desarrollo embrionario sobre los porcentajes de preñez es un factor que ha sido estudiado por diversos autores con resultados heterogéneos. La transferencia de embriones que presentan un estadio de desarrollo más avanzado que una mórula temprana, tiene un efecto superior en cuanto la tasa de preñez (Oyuela & Jiménez, 2010).

El número de embriones colectados por cada vaca donante no guarda relación con el número de cuerpos lúteos presentes en el examen ginecológico para los dos protocolos de superovulación. Estos resultados tienen similitud con los obtenidos por Betancourth y Cáceres (2011), quienes utilizaron el método no quirúrgico de recolección de embriones.

Al comparar los dos protocolo de superovulación podemos determinar que el protocolo que utiliza FSH-p presentó una mejor respuesta ovárica, reflejada en el número se ovulaciones 67 (cuerpo lúteo), frente al tratamiento de superovulación con eCG que registró 50 cuerpos lúteos; posiblemente esto se debe a que la concentración de FSH se mantiene constante ya que esta hormona debe ser administrada dos veces diarias, cada 12 horas.

De acuerdo a los resultados de la investigación podemos establecer que el número de embriones colectados por cada vaca donante fue inferior al número de

cuerpos lúteos presenten en el examen ginecológico. La variabilidad que presenta entre el número de cuerpos lúteos y embriones colectados se debe a varios factores como: la docilidad del animal, aplicación de una insuficiente cantidad de anestesia epidural, búsqueda de los embriones a través de estereomicroscopio, pero el factor más importante es la destreza y experiencia que presenta el operador en el momento del lavado uterino.

El tratamiento superovulatorio provoca una aceleración en el crecimiento de algunos folículos y una inhibición de la atresia de los folículos, debido a la administración de hormonas exógenas. Se produce un alto índice anormal de folículogénesis por administración de gonadotropinas durante la fase normal del diestro de un ciclo estral. Una concentración constante de FSH proporciona un medio adecuado para el crecimiento de los folículos e impide la acción de la inhibina sobre los folículos subordinados facilitando su desarrollo (Abril, Castro, & Porras, 2007).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El mayor número de embriones recuperados por colecta en la presente investigación fue con FSH-p, superando en un 45.76% al tratamiento con eCG.
- Los tratamiento superovulatorios (FSH-p y eCG) tuvieron una influencia directa en el porcentaje de embriones colectados de acuerdo a los grados de calidad embrionaria (*chi-cuadrado*: 7.97, p: 0.0467).
- El tratamiento superovulatorio con FSH-p utilizado en la presente investigación, permitió obtener el mayor porcentaje de calidad embrionaria de Grados I (34.88%) y II (39.53%). Los embriones que corresponde al Grado I y II de calidad, son embriones considerados como óptimos por su alta supervivencia al proceso de crio-preservación y/o descongelación, con las más altas tasas de preñez en un programa de Transferencia de Embriones
- Los tratamiento superovulatorios (FSH-p y eCG) tuvieron una influencia directa en el porcentaje de embriones colectados de acuerdo al estadio de desarrollo embrionario (valor *chi-cuadrado*: 16.30, p: 0.0225).
- La mayor producción de embriones colectados en estadio de desarrollo de blastocisto temprano (16.28%), blastocisto (27.91%) y blastocisto expandido (2.33%) se obtuvo con el tratamiento FSH-p; mientras que ambos protocolos superovulatorios produjeron un porcentaje semejante de embriones en estado de mórula (37,00%).
- El número de embriones colectados por cada reproductora donante es inferior al número de cuerpos lúteos, esta desfase puede deberse a la deficiente preparación de las donantes para el lavado uterino o a una búsqueda poco profunda de los embriones colectados.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda el tratamiento de superovulación que utiliza la FSH-p, debido a que presentó la mejor respuesta superovulatoria en cuanto a la cantidad, calidad y estadios de desarrollo embrionario.
- Incrementar el número de animales en posteriores investigaciones que ayuden a establecer diferencias entre los tratamientos utilizados.
- Es importante que animales sometidos a tratamientos superovulatorios sean evaluados mediante un examen anatómico y ecográfico del aparato reproductor, tal como se realizó en la investigación, para evitar complicaciones en el momento de la inseminación artificial y/o rescate de embriones.
- Las donantes seleccionadas deben recibir una adecuada suplementación, tanto de minerales como balanceado, para mantener o mejorar la condición corporal y/o respuesta superovulatoria.

5.3 Bibliografía

- Abril, J., Castro, J., & Porras, J. (2007). Evaluación del tratamiento superovulatorio con extracto de hipófisis equina en yeguas criollas. *Revista de Medicina Veterinaria*, 51-60.
- Aller, J., Abalos, M., Acuña, F., Virgili, R., Requena, F., & Cancino, A. (2015). Embryo yield in llamas synchronized with two different intravaginal progesterone-releasing devices and superovulated with eCG. *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)*, 13(3).
- Andino, P. (Mayo de 2014). *Evaluación de dos Programas de Superovulación en Vacas Lecheras*. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4284/1/20T00559.pdf>
- Atuesta, J. E., & Gonella, D. Á. (2011). Control Hormonal del Ciclo Estral en Bovinos y Ovinos. *Spei Domus*, 7(14): 15-25.
- Ávila, G. (2013). Transferencia de embriones. *Memoria del curso teórico práctico sobre Transferencia de Embriones en ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de México*, 19-31.
- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación en bovino. *Sitio argentino de producción animal*. Obtenido de http://produccionbovina.com/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf
- Betancourth, J., & Cáceres, G. (2011). Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales. *ZAMORANO CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA*, 1-54.
- Bó, G., & Mapletoft, R. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)*, V. 10, p: 344-348.
- Cabodevila, J., & Torquati, S. (2001). Superovulación de Hembras Bovinas. En G. Palma, *Biotecnología de la Reproducción* (págs. 79 - 98). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Callejas, S. (2001). Fisiología del Ciclo Estral Bovino. En G. Palma, *Biotecnología de la Reproducción* (págs. 37- 52). Argentina : Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria .
- Colazo, M. C., & Mapletoft, R. J. (2014). Fisiología del Ciclo Estral Bovino. *Livestock Research Branch*, 1-14.
- Córdoba, A. (2011). *Protocolos de Sincronización y Superovulación para Transferencia de Embriones en Bovinos*. Obtenido de Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias : <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3050/1/mv167.pdf>
- Cordovez, Z. d. (2010). *Evaluación de los Parámetros Productivos y Reproductivos en la Transferencia de Embriones en vacas de la Hacienda Miraflores Bajo N°2*. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1032/1/17T01031.pdf>
- De la Fuente, J. (Mayo de 2009). *Reproducción Asistida en el Vacuno de Leche*. Obtenido de Instituto de Estudio Postgrado Universidad de Córdoba: http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/17_12_54_3_CORDOBA_completo_1.pdf

- DeJarnette, M., & Nebel, R. (2007). Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina . *Select Reproductive Solutions*, 1-6.
- Dietl, J. (1986). *Struktur and funktion der zona pellucida*. Stuttgart: Ferdinans enke verlag.
- Elli, M., & Fatro, M. (2010). Manual de reproducción en ganado vacuno. En M. Elli, & M. Fatro, *Fecundación y placentación* (págs. 65-100). Zaragoza, España: Servet.
- Factores que afectan la Superovulación en Bovinos. (2007). *Porduccion Animal*, 1-18.
- Fonseca, J., Silva Filho, J., Pinto Neto, A., & Palhares, M. (2001). *Estudios de desarrollo embrionario de vacas cebuinas superovuladas*. Brasil: Instituto de Investigacion 3, el estudio y la Universidad Cientifica ambiente Paranaense Umuarama, PR.
- Garzón, N., Urrego, R., & Giraldo, C. (2007). Algunos Factores que Afectan los Tratamientos de Superovulación en la Tranferencia de Embriones Bovinos . *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 68 - 77.
- Görlach, A. (1997). *Transferencia de embriones en ganado vacuno*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Gottsch ML, C. M. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145: 4073-4077.
- Gutiérrez, C., Rangel, L., & Lassala, A. (2012). Pubertad, Ciclo Estral y Estacionalidad. En C. Galina, & J. Valencia, *Reproducción de Animales Domésticos* (págs. 85-116). México: Limusa.
- Iñiguez, F. (2010). *Manipulacion del Ciclo Estral en Ganado Bovino*. Obtenido de Virbac al día: <http://www.webveterinaria.com/virbac/news23/bovinos.pdf>
- Jiménez, C. (2009). Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Revista de medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56, 195-214.
- Juárez, L., & Valencia, J. (2012). Transporte de gametos y Fertilización. En C. Galina, & J. Valencia, *Reproduccion de Animales Domésticos* (págs. 127-158). México : Limusa.
- Linder, G., & Wright, R. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), 407-416.
- Lonidas, G. (2006). Técnica de Transplante de Embriones en ganado Vacuno. *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira*, 1-7.
- MAGAP. (2015). *ADQUISICION DE 1000 CABEZAS DE GANADO BOVINO EN PIE DE APTITUD CARNICA PARA EL REPOBLAMIENTO Y MEJORAMIENTO GENETICO DEL HATO NACIONAL DENTRO DEL PROYECTO NACIONAL DE GANADERIA SOSTENIBLE*. QUITO: MAGAP.
- Mogollón, É., & Burla, A. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus*, 9.
- Noden, D., & Lahunta, A. (1985). Early stages of development in bird and mammals. En Williams, & Wilkins, *The embryology of domestic animals* (págs. 23-46). Stamathis .
- Olivera, R. (2014). Uso de gonatrina coriónica equina en la sincronización de la ovulación y el mantenimiento de la gestación en vacas de carne. *Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)*, 1-72.

- Orellana, J., & Peralta, E. (Diciembre de 2007). *Manual de procedimiento para el laboratorio de Transferencia de Embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies*. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/758/1/T2520.pdf>
- Orrellana, J., & Peralta, E. (2007). Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies. *Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano*, 10-25.
- Oyuela, L., & Jiménes, C. (2010). Factores que afectan la tasa de preñez en programas de Transferencia de Embriones. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia*, 159-167.
- Palma, G. (1993). Recolección de los embriones. En G. Palma, & G. Brem, *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina* (Primera ed., págs. 105-126). Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur S.A.
- Palma, G. (2001). Evaluación Morfológica de los Embriones Bovinos. En G. Palma, *Biotecnología de la Reproducción* (págs. 125 - 132). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Palma, G. (2001). Recolección de los Embriones Bovinos . En G. Palma, *Biotecnología de la Reproducción* (págs. 109-123). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria .
- Palma, G., & Gottfried, B. (2001). Biotecnología de la Reproducción. En G. Palma, *Biotecnología de la Reproducción* (págs. 1-14). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- PROSEGAN. (01 de Enero de 2009). *Productos y Servicios Ganaderos* . Obtenido de Superovulación en Bovinos : <http://jairoserrano.com/2009/01/superovulacion-en-bovinos/>
- Quintela, L., Díaz, C., García, J., Peña, A., & Becerra, J. (2006). Ecografía y Reproducción en la Vaca. En L. Quintela, C. Díaz, J. García, A. Peña, & J. Becerra, *Principios de la Ecografía* (págs. 11 - 19). España: Universidad de Santiago de Compostela.
- Rippe, C. (2009). El Ciclo Estral. *The Dairy Cattle Reproduction Conference*, 111-116.
- Rivadeneira, V. (2013). Ciclo Estral Bovino. *Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos*, 1- 16.
- Rivera, F., Mendonca, L., Lopes, G., Santos, J., Perez, R., Amstalden, M., . . . Chebel, R. (2011). Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Society for Reproduction and Fertility*, 1470-1626.
- Senger, P. (2003). *Pathways to pregnancy and parturition* (Segunda ed.). Pullman, Washington, USA: Cadmus Professional Communications.
- Sintex. (2005). Fisiología Reproductiva del Bovino. *Laboratorio de Especialidades Veterinarias* , 1- 4.
- Stingfellow, D., & Siedel, S. (2000). *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS)*. Illinois, USA. Obtenido de <http://www.iets.org>

- Tovío, N., Duica, A., & Grajales, H. (2008). Desarrollo Embrionario y Estrategias Antiluteolíticas Hormonales en Programas de Transplante de Embriones Bovinos. *Rev. MVZ Córdoba*, 13(1):1240-1251.
- Wrenzycki, C., & Niemann, H. (2010). Biotécnicas Asociadas a los Embriones . En W. Brush, & D. Waberski, *Manual de Inseminación Artificial de los Animales Domésticos y de Explotación Zootécnica* (págs. 155 - 160). España: ACRIBA, S.A.