

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL**



**TASA DE PREÑEZ DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES  
FRESCOS EN VACAS RECEPTORAS HOLSTEIN CON CELO  
SINCRONIZADO O CON CELO NATURAL**

**Trabajo monográfico presentado para optar el Título de**

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

**Valerie Núñez Beltrán**

**Patrocinador: Ing Amalia Gallegos Cárdenas**

**LIMA – PERÚ**

**2014**

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Agraria la Molina por ser mi alma mater y brindarme los conocimientos científicos, tecnológicos y humanos.
- A mis padres y hermanos, por el apoyo en toda mi formación profesional y personal.
- A INIA por el apoyo técnico, a los ingenieros encabezado por Cesar Osorio Zavala, Oscar Rengifo Garrido, Enrique WatanabeSusumu que conjuntamente con mi persona se realizó este trabajo.
- Al jurado de esta monografía por sus recomendaciones y sugerencias, Ing. Amalia Gallegos Cárdenas por ser asesora del presente trabajo.
- Al Ing. Oscar Rengifo Garrido, por el apoyo en la realización del presente trabajo, compañero de trabajo y de vida.
- A la Ing. YulianaBocangel Gallegos, por permitir las facilidades prestadas en la realización de la investigación y en general los trabajadores del establo Lactea que hicieron posible el desarrollo del presente trabajo.
- Al Ing. Orlando Chipana Quispe, por su apoyo en el presente trabajo.
- A todas las personas que de alguna y otra forma colaboraron en la realización del presente trabajo.

## CONTENIDO

	Página
Resumen.....	i
I. Introducción.....	1
II. Revisión literaria.....	2
a. Generalidades.....	2
b. Donadoras.....	2
c. La superovulación en la hembra donante.....	3
d. Receptoras.....	3
e. Protocolos de sincronización para la transferencia de embriones (TETF).....	4
III. Materiales y métodos.....	8
a. Lugar de ejecución.....	8
b. Instalaciones.....	8
c. Animales experimentales.....	8
d. Donadoras.....	8
e. Receptoras.....	9
f. Análisis de resultado.....	10
IV. Resultados.....	11
V. Discusión.....	13
VI. Conclusiones.....	14
VII. Recomendaciones.....	15
VIII. Bibliografía.....	16
IX. Anexo.....	19

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1. Número de vacas en celo, seleccionadas para recibir un embrión (transferidas) y porcentajes de preñez en receptoras de embriones sincronizadas con PGF.....	5
Cuadro 2. Porcentaje de preñez utilizando vaquillas receptoras de embriones transferidas a los 7 días de la observación de celos naturales o inducidas por diferentes tratamientos de sincronización. ....	6
Figura 1. Protocolo de Superovulación de las vacas donadoras.....	9
Figura 2. Protocolo de Sincronización para la transferencia de embriones en receptoras.....	10
Cuadro 3. Tratamiento celo natural y celo sincronizado.....	10
Cuadro 4. Porcentaje de preñez.....	11
Cuadro 5. Producción de embriones transferidos, congelados y receptoras preñadas acuerdo a la raza de la donadora.....	11
Cuadro 6. Porcentaje de cuerpo lúteo en los animales tratados.....	12
Cuadro 7. Protocolo de Superovulación (SOV) de Donadoras y Protocolo de transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF) para receptoras.....	19
Cuadro 8. Materiales para la transferencia de embriones.....	19
Cuadro 9. Hormonas utilizadas en Superovulación y TETF.....	20

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la provincia de Virú en el departamento de La Libertad, en el establo lechero Láctea que cuentan con vacas de las razas Holstein, Jersey y Brown Swiss. La investigación tuvo como objetivo comparar la tasa de preñez en vacas receptoras sincronizadas y con celo natural, siendo ambos grupos transferidas con embriones frescos. Se seleccionaron por genealogía y productividad a 12 animales como donadoras, las cuales fueron sometidas a un protocolo superovulatorio.

Vacas de raza Holstein con más de 60 días en lactancia y con condición corporal de 2.5 a 3.5 fueron seleccionados como receptoras que fueron distribuidos al azar en dos grupos: con celo natural y celo sincronizado. Se transfirió a las receptoras en el día 7 post colecta de embriones.

Se obtuvieron un total de 67 embriones transferibles, de los cuales 20 embriones fueron congelados y 47 fueron utilizados para ser transferidos en fresco a las receptoras, previamente divididas en 2 grupos: 26 en celo natural y 21 en celo sincronizado. Al hacer las comparaciones no se encontró diferencias significativas en la tasa de preñez entre ambos grupos de presentación de celos siendo con celo natural 14/26(53.9%) y con celo sincronizado 12/21(42.9%).

De los resultados obtenidos se puede inferir que una alternativa para aumentar el aprovechamiento de las receptoras para recibir al embrión en el momento de la transferencia es el uso de protocolos de sincronización de la ovulación para la realización de la transferencia de embriones en tiempo fijo (TETF), eliminando la necesidad de detección de celo que es un factor limitante por el número reducido de animales.

## I. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de la implantación de técnicas biotecnológicas en la rama de la reproducción como la transferencia de embriones en ganado vacuno, es el mejoramiento genético ya que permite multiplicar rápidamente los animales élite. Existen factores que pueden afectar el uso de estas tecnologías como son la nutrición, la sanidad, el manejo y la eficiencia en la detección de celo.

Uno de los inconvenientes en un programa de transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF) es la disponibilidad de receptoras aptas, por tal motivo se viene realizando esfuerzos para el uso eficiente de las mismas logrando una mayor eficiencia en la tasa de preñez. Las vacas receptoras pueden ser seleccionadas por un programa de detección de celos naturales o de celos inducidos mediante tratamientos hormonales. Independientemente del método utilizado, es importante tener una buena precisión en la detección de los celos, debido a que este aparece como un factor clave y uno de los que más afecta el costo de mantenimiento de una receptora desde que entra al programa hasta que queda preñada (Bó y col., 1996; Beal y Hinshaw, 2001).

Una alternativa eficaz para aumentar el número de receptoras que puedan recibir un embrión en el momento de la transferencia es el uso de protocolos de sincronización de la ovulación para la realización del TETF, eliminando así la necesidad de la detección de celo. Como en los programas de TETF la detección de celo generalmente ya no es realizada, el día 10 es considerado el día del celo. Todas las receptoras con un CI aparentemente funcional en el día 17 reciben un embrión, la tasa de preñez/TE ha sido comparada a las obtenidas con transferencia de embrión 7 días después del celo observado (Bo et al., 2000, 2012).

Por lo mencionado anteriormente la idea principal del presente trabajo es buscar una alternativa que permita aprovechar al máximo a la donadora de alto valor genético, aprovechando el reducido número de receptoras disponibles teniendo como resultado una exitosa tasa de preñez y posteriormente un reemplazo élite para el establo ganadero.

La investigación tiene como objetivo comparar la tasa de preñez lograda en vacas receptoras sincronizadas y con celo natural de transferencia de embriones frescos de vacas Holstein, Brown Swiss y Jersey

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **a. Generalidades**

La transferencia de embriones es de las técnicas más utilizada en todo el mundo para multiplicar animales de alto valor genético (Bó., 2000). Entre los principales factores que afectan el uso de estas tecnologías están relacionados con la nutrición, manejo, y la eficiencia en la detección de celo (Bó, et al. 2012).

En los últimos años, muchos esfuerzos han sido realizados para el desarrollo de protocolos hormonales que permitan el uso eficiente de las receptoras y resulte en elevada tasa de preñez. Una de las alternativas para un aumento del número de receptoras disponibles para los programas de transferencia de embriones es el uso de protocolos hormonales que permitan la transferencia de embriones sin detección de celo, denominada transferencia de embriones en tiempo fijo (TETF) (Bó, et al. 2012).

### **b. Donadoras**

Es importante hacer una adecuada selección de la hembra donante ya que ésta interviene directamente en los resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica. Además de la superioridad genética en éstas, se deben tener en cuenta factores como ciclos estrales regulares, precocidad reproductiva, dos o menos servicios por concepción en los años anteriores, comportamiento individual superior a la media del grupo en características de importancia productiva (peso al destete, al año y a los dieciocho meses), que produzca crías superiores a la media del hato, especialmente comparado con las hermanas de la hembra (descendientes del mismo toro), ningún problema al parto, ninguna irregularidad reproductiva, así como ningún defecto genético o de conformación detectable (Bó, 2002).

Se debe evitar el uso de animales obesos como donantes, ya que esta condición puede incidir directamente sobre la producción de los embriones (Palma, 2001). Todos estos factores acompañados de un excelente manejo sanitario van a hacer que se obtengan óptimos resultados en el proceso de obtención de embriones.

### **c. La superovulación en la hembra donante**

En la técnica de transferencia de embriones (TE) se busca que la hembra donante de embriones, ovule no una sino varias veces, por este motivo se comenzó desarrollar una técnica que brinda la biotecnología de la reproducción llamada multiovlación o superovulación de las hembras donantes de embriones. El objetivo principal de los

tratamientos de superovulación en vacas es producir un gran número de folículos ovulatorios, que van a generar un número mayor de oocitos, para el momento de la IA obtener el máximo número de embriones transferibles (Adams, 1992).

La hormona folículo estimulante(FSH) se utiliza en protocolos superovulatorios de 4 días de aplicación dentro del marco del protocolo de sincronización, de esta manera, poder obtener un ciclo sincronizado, en el que se controla el desarrollo folicular y una multiovulación desencadenada por la aplicación exógena de hormona FSH. El protocolo de superovulación completo hasta el día de colecta de embriones dura 17 días. El día cero, se inserta el dispositivo intravaginal de liberación lenta de progesterona, sumado a este, el mismo día se aplica benzoato de estradiol para así producir un efecto supresor sobre la producción de gonadotropinas a nivel hipotalámico, al no liberarse la hormonas gonadotrópicas se va a inducir atresia en los folículos antrales que se encuentren en ese momento presentes a nivel ovárico (Baruselli, 2003). El día 4 disminuye dicho bloqueo, ya que los niveles de estrógeno exógeno disminuyen; este es el día ideal para iniciar el tratamiento súper ovulatorio ya que se inicia la onda de desarrollo folicular. Al iniciar este día la aplicación de la FSH antes que se de la selección del folículo dominante se obtendrá el crecimiento de un grupo de folículos logrando el objetivo de la técnica de multiovulación (Bungarts, 1994; Bó, 1996); la aplicación de la FSH se hace durante cuatro días en aplicaciones cada 12 horas para tener los niveles necesarios de hormona en el organismo del animal, permitiendo que esta ayuda hormonal produzca una multiovulación efectiva (Hasler, 1993). El día 6 se aplica prostaglandina F2 $\alpha$ , con el fin de producir la lisis de cualquier cuerpo lúteo que se encuentre presente a nivel ovárico, el día 7 se retira el dispositivo de liberación lenta de progesterona con el objetivo de aumentar la liberación de estrógeno y el día 8 se aplica GnRH la cual va a producir una liberación transitoria de LH para favorecer la ovulación, seguido de la inseminación artificial a tiempo fijo 12 y 24 horas después de la aplicación de la GnRH, realizando finalmente una colecta de embriones el día 17 (Baruselli, 2003).

Después de colectados los embriones se realiza la TE en fresco a hembras receptoras, que están sincronizadas y se encuentran en el día 7 después de la ovulación para que coincida con la edad del embrión; o también es posible criopreservar los embriones.

#### **d. Receptoras**

En el éxito de un programa de TE influyen muchos factores, pero tal vez uno de los más importantes es la selección de las hembras receptoras; estas deben ser saludables y



reproductivamente sanas (Huertas1991), verificando la presencia de estructuras que demuestren ciclicidad a nivel ovárico.

En la evaluación de las estructuras ováricas en las hembras receptoras de embriones, por medio de ultrasonografía trans-rectal, se ha podido determinar que el folículo preovulatorio afecta de manera directa el subsecuente tamaño del cuerpo lúteo, observando que un folículo preovulatorio de 1,3 cms da paso a un cuerpo lúteo que el día siete mide 5mm y produce niveles de progesterona plasmáticos de 1,22 ng/mL y el día 14 el cuerpo lúteo mide 6 mm y genera concentraciones plasmáticas de progesterona de 2,48 ng/ml. Así mismo, un folículo preovulatorio de mayor tamaño (1,6 cms) da paso a un cuerpo lúteo que el día siete mide 6 mm y produce unos niveles de progesterona plasmáticos de 1,61 ng/mL y el día 14 el mismo cuerpo lúteo mide 9 mm, generando unas concentraciones plasmáticas de 3,05 ng/mL ( $P < 0,05$ ); así, al haber una mayor producción de progesterona plasmática se esperaría generar unas condiciones uterinas más favorables para el desarrollo embrionario temprano. Por eso es importante determinar el tamaño de las estructuras ováricas antes de realizar la transferencia del embrión a la hembra receptora, lo cual permite obtener mejores resultados después de la aplicación de la técnica de TE (Vasconcelos, 2001).

Al realizar seguimiento de la estructuras ováricas por medio de ultrasonografía a un grupo de 140 animales, los cuerpos lúteos de más de dos centímetros de diámetro producen niveles de progesterona circulantes de 2,44 ng/mL, y una tasa de concepción del 58% en hembras a las que se le transfirió un embrión el día siete postcelo; a las hembras que se les encontraron cuerpos lúteos de 1,5 centímetros de diámetro producen niveles de progesterona circulantes de 1,75 ng/mL, y una tasa de concepción del 41%; y, a las hembras a las que se les encontraron cuerpos lúteos menores de 1,5 centímetros de diámetro presentaron niveles de progesterona circulantes de 1,19 ng/mL, y una tasa de concepción del 31% ( $P < 0.05$ )(Baruselli, 2001).

#### **e. Protocolos de sincronización para la transferencia de embriones (TETF)**

La utilización de la prostaglandina ( $PGF_{2\alpha}$ ) y sus análogos es ampliamente empleada con la finalidad de sincronizar las manifestaciones de celo del ganado bovino (Odde, K.G. 1990). La  $PGF_{2\alpha}$  causa la regresión del cuerpo lúteo (CL) a partir del día 5 del ciclo estral y su efecto luteolítico es máximo entre los días 12 y 17 (Momont, et. Al., 1984). Sin embargo, el estadio del folículo dominante en el momento de la aplicación de la  $PGF_{2\alpha}$  va a producir una variación del momento del celo y la ovulación de 2 a 7 días (Kastelic, et al. 1991).

La limitante de los programas de sincronización con sólo PGF hace que el porcentaje de aprovechamiento real de las receptoras que son seleccionadas para recibir un embrión raramente supere el 50% (Bó, y col. 2002). Lo descrito anteriormente lo podemos observar en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Número de vacas en celo, seleccionadas para recibir un embrión (transferidas) y porcentajes de preñez en receptoras de embriones sincronizadas con PGF2 $\alpha$  (Burry E., comunicación personal)

	Tratadas	En celo/ Tratadas	Transferencia/ Tratadas	Preñadas/ Transferidas	Preñadas/ Tratadas
Matto Grosso (Brasil, 2000)	854	384/854 (45,0%)	226/854 (26,5%)	89/226 (39,4%)	89/854 (10,4%)
Santa Cruz (Bolivia, 2001)	700	479/700 (68,4%)	223/700 (31,9%)	111/223 (49,8%)	111/700 (15,9%)
Total	1554	863/1554 (55,5%)	449/1554 (28,9%)	200/449 (44,5%)	200/1554 (12,9%)

Estos resultados demuestran que la utilización de PGF2 $\alpha$  para la sincronización de celos en receptoras de embriones resulta en una muy baja tasa de aprovechamiento de receptoras que afectan considerablemente los porcentajes de preñez general.

Los progestágenos son compuestos similares a la progesterona que están en el mercado desde hace varios años y se usan para sincronizar el celo en programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). El uso de estrógenos y progestágenos para controlar el desarrollo folicular se basa en el potente efecto de la combinación de estos esteroides sobre las gonadotropinas (Bo y col., 1994).

Los dispositivos intravaginales con Progesterona (P4), combinados con Benzoato de Estradiol (BE) al momento de la colocación del dispositivo y BE 24 h después de su retiro, pueden ser utilizados para sincronizar la ovulación, eliminando la necesidad de la detección de celos en grupos de receptoras de embriones. (Bo y col, 2001). Sin embargo, en estudios el porcentaje de vacas con un CL detectado por palpación rectal en el momento de la transferencia fue bastante bajo (<60%) y los índices de preñez finales

(preñadas/tratadas) no superaban el 40%, lo que representa un alto costo en tratamientos y receptoras no utilizadas. Por lo tanto, se realizaron una serie de experimentos para tratar de aumentar el número de receptoras utilizadas y los índices de preñez general por tratamiento.

Otra alternativa para incrementar los niveles circulantes de P4 en receptoras de embriones es la inducción de ovulaciones múltiples mediante la utilización de gonadotropina coriónica equina (eCG) durante el tratamiento de sincronización de la receptora. Fuentes S. y De la Fuente. 1997, reportaron datos de un experimento en el que se utilizaron vaquillas Holstein que fueron divididas en cuatro grupos. El primer grupo fue formado por vaquillas a las que se les observó un celo natural (CN; n=52) y fueron transferidos 7 días luego de la detección del celo (Control). El resto de los animales fueron sincronizados. Las vaquillonas del Grupo PGF2 $\alpha$  (n=58) recibieron una dosis única de 500  $\mu$ g de cloprostenolim (Estrumate, Schering- Plough). Las vaquillonas del Grupo PRID (n=54) recibieron en el día 0 un PRID (CEVA, 1,55 g de P4) y una cápsula con 10 mg de BE y cloprostenol cuando se retiró el dispositivo en el día 10. Las vaquillonas del Grupo PRID+eCG (n=29), recibieron un PRID (sin la cápsula) junto con 5 mg de estradiol-17 $\beta$  y 100 mg de P4im en el día 0, 1.000 UI de eCGim en el día 4, cloprostenol en el día 6 por la mañana y se retiraron los dispositivos en el día 7 por la tarde. En este experimento se detectó celo en todos los grupos y las vaquillonas fueron transferidas a los 7 días de la observación de los celos. Como puede observarse en el cuadro 2, el tratamiento con PRID+eCG produjo un incremento en el número de receptoras transferidas y aumentó el porcentaje final de preñez (preñadas/tratadas).

Cuadro 2. Porcentaje de preñez utilizando vaquillas receptoras de embriones transferidas a los 7 días de la observación de celos naturales o inducidas por diferentes tratamientos de sincronización. Adaptado de Fuentes y de la Fuente, 1997

	Control	PGF2 $\alpha$	PRID	PRID+eCG	Valor P
Transferidas/tratadas	26/52	26/58	26/54	26/29	0,0001
	(50,0%)a	(44,8%)a	(48,9%)a	(89,7%)b	
Preñadas/transferidas	15/26	11/26	12/26	17/26	0,1
	(57,7%)	(42,3%)	(46,1%)	(65,3%)	
Preñadas/tratadas	15/52	11/58	12/54	17/29	0,008
	(28,8%)a	(18,9%)a	(22,2%)a	(58,6%)b	

En este experimento también se observó que el tratamiento con eCG aumentó significativamente el número de CL en los ovarios de las vaquillas, que presentaron entre 2 y 5 CL en cada ovario en el momento de la transferencia.

La tasa de preñez por embrión transferido (P/TE) después TETF es similar por aquella obtenida después de la detección del celo. No obstante, la tasa de preñez en general, es decir, el número de hembras preñadas sobre el número total de hembras aptas/sincronizadas es mayor en los programas de TETF, una vez que ese tratamiento aumenta la proporción de receptoras aptas para recibir un embrión en el momento de la transferencia. (Bo y col, 2012).

En otro Experimento, para evaluar la utilización de una dosis más reducida, de 400 UI de eCG (Novormón 5000, Syntex, Argentina), para determinar si se podía mantener efecto positivo sobre la preñez y disminuir un poco los costos del tratamiento (Tribulo H y Col., 2002). Para este experimento se utilizaron 312 vacas de carne secas (cruza cebú) de 3 a 5 años de edad y con una condición corporal de 2,5 a 3,5 (Escala 1-5). En el día 0, todas las vacas recibieron un DIV-B, conjuntamente con 2 mg de BE y 50 mg de P4 im. En el día 5 (un día después del comienzo estimado de la onda folicular), todas las vacas recibieron 500 µg de cloprostenolim y la mitad de las receptoras (Grupo eCG) recibió 400 UI de eCG im, mientras que la otra mitad (Grupo Control) recibió una inyección de 1,5 ml de solución fisiológica im. En ambos grupos los DIV-B fueron retirados en el día 8 y se inyectó 1 mg de BE im en el día 9. No se realizó detección de celo y se determinó arbitrariamente al día 10 como el día del celo y al día 11 como el día de la ovulación. Como en el experimento anterior, el día anterior a la transferencia de embriones (día 16) se examinaron todos los animales por medio de ultrasonografía transrectal con el objetivo de determinar el tamaño del CL y las vacas con un CL = 10 mm de diámetro fueron seleccionadas y recibieron en el día 17 embriones congelados (Grado 1, n=206, Grado 2, n=49 y Grado 3, n=4) asignados equitativamente a ambos grupos. A pesar de que el tratamiento con eCG no resultó en muchas ovulaciones múltiples (3/156, 2% de las vacas tuvieron 2 CL), el tamaño promedio de los CL fue mayor ( $P < 0.05$ ) en las vacas tratadas con eCG ( $18,5 \pm 0,4$  mm) que en las no tratadas con eCG ( $17,7 \pm 0,4$  mm). Además, las proporciones de receptoras preñadas fueron mayores ( $P < 0,02$ ) en el grupo que recibió eCG en el día 5. (48,7% v.s. 33,9%).

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **a. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se realizó en el establo ganadero “Lactea S.A”, del grupo Rocio, en la provincia de Viruen el norte del Perú, en la parte sur del departamento de La Libertad.

La temperatura media anual fluctúa entre los 18°C y 26°C, teniendo un promedio superior a los 20° C. La precipitación es muy baja y se considera inferior a 50 mm/año. De igual manera la humedad es demasiado baja pudiéndose aceptar que se encuentra entre 70% y 80%.

#### **b. Instalaciones**

Las donadoras y receptoras fueron manejadas bajo un sistema estabulado y para la realización de la parte experimental se utilizaron las siguientes instalaciones:

- Ambiente de laboratorio.
- Manga de manejo y brete con pendiente inclinada para la colecta de embriones.
- Manga de manejo para el manejo de las receptoras.
- Corrales con comederos, bebederos y sombra.

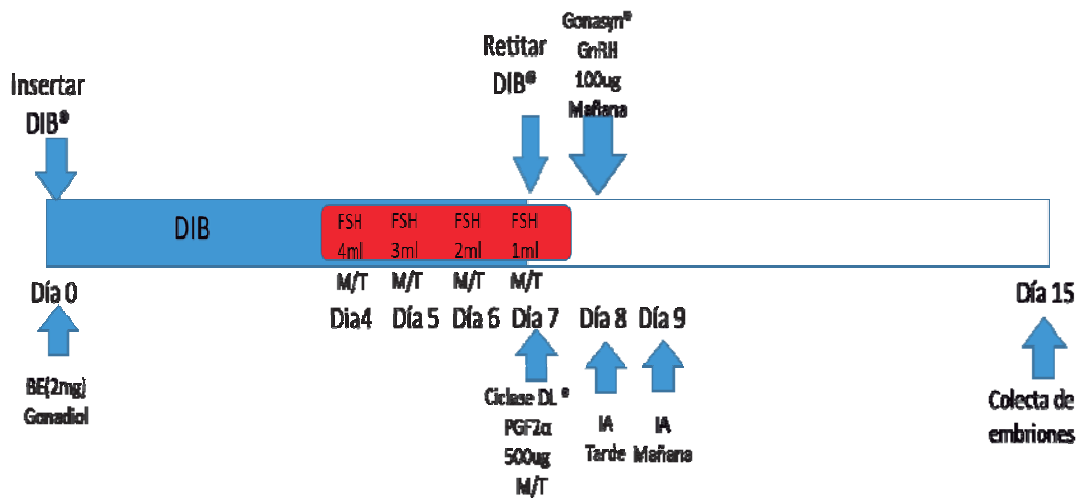
#### **c. Animales experimentales**

En el establo Láctea cuenta con más de 2000 vacas en ordeño de las razas Holstein, Jersey y Brown Swiss, dentro de las cuales se seleccionaron a 12 donadoras por genealogía y productividad del lote superior, las cuales fueron sometidas a un protocolo superovulatorio. En cuanto a las receptoras se trabajó con 25 vacas que fueron tratadas con protocolo de sincronización y con 34 vacas con celo natural.

#### **d. Donadoras**

Se seleccionaron a 12 donadoras (7 Brown Swiss, 4 Holstein y 1 Jersey) por genealogía y productividad del lote superior, las cuales fueron sometidas a un protocolo superovulatorio, comenzando por el día 0 con la aplicación de un implante vaginal de progesterona (DIB® 1.0g) juntamente con una dosis de 2mg de Benzoato de Estadiol (Gonadio®), en el día 4 se inició la aplicación de la hormona foliculo estimulante (Folltropin®) durante 4 días en dosis decrecientes por la mañana y por la tarde en intervalo de 12 horas (80mg, 60mg, 40mg y 20mg), el día 7 por la mañana se retiró el implante, por la mañana y por la tarde se aplicó 2 dosis de 500ug de Cloprostenol (PGF2α) (Ciclase

DL®), el día 8 por la mañana se aplicó 100 ug Acetato de Gonadorelina (Gonasyn®), por la tarde del mismo día se realizó la primera inseminación y el día 9 por la mañana se realizó la segunda inseminación artificial, 7 días después de la primera inseminación se realizó la recolección de los embriones con el sistema de circuito cerrado. Los embriones fueron manejados y clasificados de acuerdo a las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) y posteriormente transferidos en un medio Holding (mantenimiento). En la figura 1 se muestra el protocolo de superovulación en donadoras.



**Figura 1.** Protocolo de Superovulación de las vacas donadoras

### e. Receptoras

Las vacas receptoras de la raza Holstein con más de 60 días en lactancia con una condición corporal de 2.5 a 3.5 c.c. fueron seleccionados al azar en dos grupos: con celo natural y celo sincronizado. Las vacas sincronizadas en el día -1 con respecto a las donantes, se les colocó el implante de progesterona (DIB® 1.0 g) juntamente con 2mg de benzoato de estradiol, el día 4 se aplicó 400UI de eCG (Novormon 5000®), el día 6 se retiró el implante de progesterona (DIB® 1.0g) y se aplicó 500ug de Cloprostenol (Ciclose DL®), por último en el día 7 se aplica BE 1 mg (Gonadiol®), en el día 8 hay observación de celo. Los embriones fueron seleccionados según la IETS, en su estadio y calidad, en cuanto a su estadio de desarrollo se transfirieron en el estadio demórula y blastocisto temprano y por calidad excelente o bueno. Las receptoras sincronizadas con la edad del embrión fueron transferidas en el día 7 post celo.

En la siguiente figura se detalla el protocolo de sincronización para la transferencia de embriones (TETF)

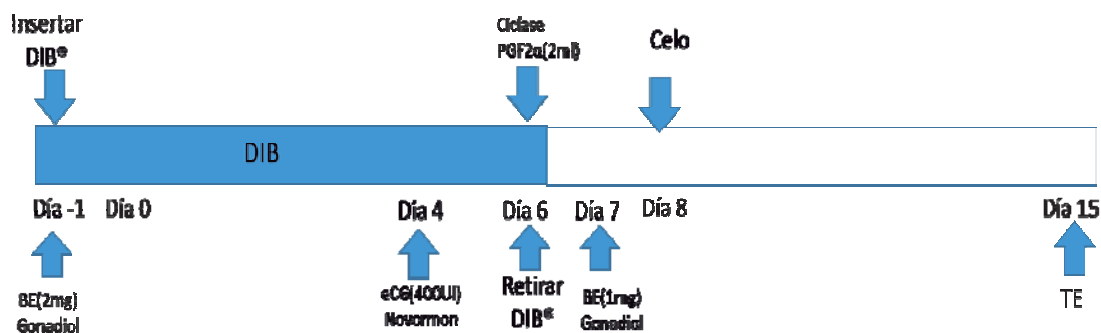


Figura 2. Protocolo de Sincronización para la transferencia de embriones en receptoras

#### f. Análisis de resultado

Los resultados de preñez de las vacas receptoras (celo natural y celo sincronizado), fueron analizados mediante la prueba estadística Chi<sup>2</sup>, a un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  con el objetivo de conocer si existieron diferencias significativas entre las vacas de celo natural con las de celo sincronizado respecto presencia de preñez. Para el análisis estadístico se utilizó el software StatisticalAnalysisSystem (S.A.S.).

Cuadro 3. Tratamiento celo natural y celo sincronizado

	Con preñez	Sin preñez	Total
Celo natural	14	12	26
	53.85 %	46.15%	55.32%
Celo sincronizado	9	12	21
	42.86%	57.14%	44.68%
Total	23	24	47
	48.94%	51.06%	100%

Las hipótesis fueron las siguientes:

ho: vacas de celo natural = vacas de celo sincronizado, respecto a la preñez.

ha: vacas de celo natural  $\neq$  vacas de celo sincronizado respecto a la preñez.

Nivel de significancia  $\alpha=0.05$

#### IV. RESULTADOS

En el cuadro 4, se indica los resultados referidos a la presencia de cuerpo lúteo en porcentaje (%)

Cuadro 4. Porcentaje de cuerpo lúteo en los animales tratados

<b>Tratamiento</b>	<b>N° de animales tratadas</b>	<b>Presencia CL</b>	<b>N° Transferidas</b>	<b>% Transferencia (Tasa de aprovechamiento)</b>
Celo natural	34	26	26	76.47
Sincronizadas	25	21	21	84.00

En el cuadro 5, se detalla la producción de embriones de 12 vacas donadoras: Holstein, Jersey y Brown Swiss, y los resultados post transferencia de embriones a vacas Holstein.

Cuadro 5.- Producción de embriones transferidos, congelados y receptoras preñadas de acuerdo a la raza de la donadora

<b>Raza de las donadoras</b>	<b>Total embriones viables</b>	<b>N° embriones congelados</b>	<b>N° embriones transferidos</b>	<b>N° receptoras preñadas</b>
Brown swiss	37	14	23	10 (43.48 %)
Holstein	17	6	11	6 (54.55 %)
Jersey	13	0	13	7 (53.85 %)
Total	67	20	47	23 (48.94 %)

Se tiene un porcentaje de preñez 48.94 % en el total de embriones transferidos, sólo habiendo diferencia porcentual en los embriones de la raza brownswiss con 43.48 % en comparación de holstein 54.55 % y jersey 53.85 %.

Producción de embriones: Se logró un total de 67 embriones transferibles, de los cuales 20 fueron congelados y 47 fueron transferidos en fresco a las receptoras de cada grupo experimental: 26 en Celo Natural y 21 en Celo Sincronizado. Se detectó preñez con ecógrafo a los 40 días. En el cuadro 6 se indica los resultados de porcentaje de preñez.



Cuadro 6. Porcentaje de preñez

<b>Presentacion de celo</b>	<b>Vacas transferidas</b>	<b>Resultado</b>	<b>N° de animales</b>	<b>% preñez</b>
Celo natural	26	Preñada	14	53.85
		Vacia	12	
Sincronizacion de celo	21	Preñada	9	42.86
		Vacia	12	
Total			<b>47</b>	

En este caso, el valor p de  $\chi^2$  fue 0.4537, ( $p > 0.05$ ) aceptando la hipótesis nula al 5% de significancia, la cual indica que las vacas de celo natural son semejantes a las vacas sincronizadas respecto a la preñez; es decir la tasa de preñez fue independiente del grupo de vacas con o sin protocolo de sincronización de celo.

## V. DISCUSIÓN

Los porcentajes de tasa de preñez para los tratamientos como receptoras sincronizadas y celo natural fueron 53.9% y 42.9% respectivamente no encontrando diferencias significativas. Estos valores encontrados fueron similares para celo natural a lo reportado por Fuentes S. y De la Fuente J. (1997), quienes al sincronizar receptoras, reportaron una tasa de preñez de 57,7% para vacas receptoras con celo natural y 64,3% para receptoras sincronizadas con PRID® (P4) + eCG.

Así mismo, trabajos previos sincronizando receptoras con uso de eCG en el día 5 del protocolo tuvo como tasa de preñez de 48.7% mayor a la tasa de preñez del grupo que no utilizo ecG tratamiento (Tribulo H y Col., 2002) Estos datos también son similares a lo reportado por nuestro trabajo de investigación, lo cual indicaría que la aplicación de eCG el día 5 del protocolo de sincronización ayuda mucho a tener niveles altos de P4 gracias a un mayor tamaño del cuerpo lúteo e incrementaría la tasa de preñez.

Bó G. y Col, 2002, menciona que los protocolos de sincronización con prostaglandina raramente superan el 50% en el aprovechamiento de las receptoras, por tal motivo en el presente trabajo utilizamos un protocolo con mayor tasa de aprovechamiento del 84%, la cual beneficiaría en hatos con menos número de receptoras disponibles.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. El uso de protocolos de sincronización ayuda en centrales o establecimiento con reducido número de receptoras para tener una mayor tasa de aprovechamiento sin disminuir la tasa de preñez.
2. El uso de eCGen los protocolos de TE, ya que estimula a la liberación de FSH y LH provocando cuerpos lúteos accesorios y/o provocando folículos de mayor tamaño en el momento de ovulación y por ende un mayor tamaño de cuerpo lúteo, obteniendo así en ambos casos mayores niveles de P4 traducándose en una mayor tasa de preñez.
3. Se realizó una evaluación de las donadoras en las estructuras ováricas antes del TETF para garantizar al embrión un ambiente adecuado para su desarrollo post-transferencia, de tal manera que se mantenga la funcionalidad de los mecanismos luteotrópicos y se evite el desencadenamiento de los mecanismos luteolíticos.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Es recomendable el uso de protocolos de sincronización de la ovulación para la realización del TETF ya que ayuda a mejorar la eficiencia de la tasa de preñez, ya que la detección de celo visual es una limitante en el buen desarrollo reproductivo de todo establo ganadero.

La utilización de dispositivo de P4 y eCG en el día 5 del protocolo, es recomendable porque se obtiene cuerpos lúteos accesorios y/o un mayor tamaño de cuerpo lúteo a la palpación aumentando la tasa de aprovechamiento en receptoras.

Para selección de receptoras es necesario evaluar las estructuras reproductivas y examen serológicos.

El efecto de la raza del embrión podría ser medido en un posterior trabajo para asegurarnos si encontramos una diferencia estadística significativa.

La realización de la misma investigación con más grupos experimentales y con un número superior de animales, sería de ayuda para tener variabilidad y comprobar si existe alguna diferencia significativa.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Adams, G.; Matteri, R.; Gither, O. "Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers". *Journal of Reproduction* 37.(1992).

Baruselli, P. "Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices". *Theriogenology* 55. (2001).

Baruselli, P.; De Oliveira, M. "Últimos avances en superovulación de donantes de razas cebuinas". IV Seminario de reproducción de grandes animales. CGR. Bogotá. Colombia. Septiembre de 2003.

Beal WE, RH Hinshaw (2001) Synchronization of estrus and ovulation in bovine embryo transfer recipients *Proceedings of the Advanced Embryo Transfer Seminar 12 Annual Meeting of the American Association of Bovine Practitioners, Vancouver BC Canada*

Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Caccia M, Tribulo H, RJ Mapletoft (1994) Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant *Theriogenology* 41: 1555-1569

Bó, G.; Berfegfet, D.; Brogliatti, G.; Pierson, R.; Mapletoft, R. "Systemic Vs. local effect of exogenous estradiol on follicular development in heifers". *Theriogenology* 45 (1996): 333.

Bó GA, Caccia M, Martinez MF, Mapletoft RJ (1996) Follicular wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef cattle 13th International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia 7: 22

Bo GA, Tribulo H, Caccia M, Tribulo R. 2001. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. *Theriogenology*; 55:357 abstr.

Bó, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R., Tribulo, H., Mapletoft, R.J. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*; 57:53-72.

Bó, G.; Moreno, D.; Cuaita, L.; Caccia, M. "Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones". IV Seminario internacional de reproducción de grandes animales. CGR. Bogotá Colombia. Septiembre de 2003.

Bó, G.A.; Bruselli P.S.; Mapletoft R.J. Aumento da taxa de prenhez após sincronização de receptoras de embriões. Anais da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu-Brasil, Agosto 2012:206-211

Bungarts, L.; Niemann, H. "Assessment of presence of a dominant follicle and selection of a dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination". Journal Reproduction Fertility 47. (1994).

Burry E. 2002. Comunicación Personal.

Duica, A.; Tovío, N.; Grajales H. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. Revista de Medicina Veterinaria N° 14: 107-124 / Julio - diciembre 2007:107-124

Fuentes S, De la Fuente J. 1997. Different synchronization treatments for direct embryo transfer to recipient heifers. Proc XIII Annual Meeting AETE, Lyon, France; 148 abstr.

Hasler, J.; McCualey, A.; Schermerhorn, E.; Foote, H. "Superovulatory responses in Holstein cows". Theriogenology 19. (1993): 83-99.

Huertas, I.; Huertas, V. Manual práctico y moderno de inseminación artificial. Transferencia de embriones. Reproducir LTDA. 1991.

Kastelic, J.P., Ginther, O.J. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. Anim Reprod Sci; 26:13-24.

Mapletoft RJ, Bo GA, Adams GP. 2000. Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre; 28:23-48.

Mapletoft RJ, Bo GA, Adams GP. 2000. Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. *ArqFacVet UFRGS, Porto Alegre*; 28:23-48.

Momont, H.W., Seguin, B.E. 1984. Influence of the day of estrous cycle on response to PGF2a products: Implications for AI programs for dairy cattle. *Proc. 10th International Congress on Animal Reproduction*, 3, 336.

Odde, K.G. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J AnimSci*; 68:817-830.

Palma, G. *Biología de la reproducción*. Balcare. Argentina: INTA, 2001.

Thatcher WW, Moreira F, Santos JEP, Mattos RC, Lopez FL, Pancarci SM, Risco CA. 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*; 55: 75-90.

Tribulo H, Moreno D, Cutaia L, Gatti G, Tribulo R, Caccia M, Bó GA. 2002. Pregnancy rates in embryo recipient treated with progesterone vaginal devices and eCG and transferred without estrus detection. *Theriogenology*; 57:563 abstr

Vasconcelos, J.; Sartori, R.; Oliveira, H.; Guenther, J.; Wilbank, M. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56. (2001): 307 – 314.

## IX. ANEXO

Cuadro 7. Protocolo de Superovulación (SOV) de Donadoras y Protocolo de transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF) para receptoras

DIA	DONADORAS- Mañana	DONADORAS-Tarde	RECEPTORAS
-1			DIB® + 2 mgBE
0	Colocar DIB 1 g (P4) +1 ml BE		
1			
2			
3			
4	4ml FSH (Folltropin®)	4ml FSH (Folltropin®)	400 UI eCG (2ml)NOVORMON®
5	3ml FSH (Folltropin®)	3ml FSH (Folltropin®)	
6	2ml FSH + 5ml Ciclase®	2ml FSH + 5ml Ciclase®	Retirar DIB + 2 ml Ciclase DL®
7	1ml FSH – Retirar DIB®	1ml FSH	1 mgBE
8	GnRH 2.5 ml Gonasyn®	12h después IA	CELOS
9	24h después IA		apuntar fecha y hora de celo
10			
11			
12			
13			
14			
15	COLECTA Y CONGELACION DE EMBRIONES		Transferencia

Cuadro8. Materiales para la transferencia de embriones

Materiales para la transferencia		
Item	Producto	Descripción
1	Pistola de T.E.	
2	Fundas azules para T.E.	
3	Camiseta sanitaria	
4	Termo descongelador de pajilla	
5	Dilatador Cervical	
6	Cortapajilla	
7	Papel toalla	



Cuadro 9. Hormonas utilizadas en Superovulación y TETF

Producto	Descripción	Presentación
DIB	Dispositivo intravaginal bovino con 1 g de progesterona/dispositivo	Paquete con 10 dispositivos
NOVORMON 5000	Gonadotropina Corionica Equina (eCG,PMSG)	1 frasco ampolla con 5000 UI de eCG liofilizado y 1 frasco con 25 ml de solvente
CICLASE	Análogo sintético de la Prostaglandina F2 $\alpha$ (Cloprostenol 250 $\mu$ g/ml)	Frasco x 50 ml
GONASYN	Análogo sintético de GnRH(Gonadorelina Acetato 50 $\mu$ g/ml)	Frasco x 20 ml
BENZOATO DE ESTRADIOL	Análogo sintético del estradiol(Benzoato de estradion 1mg/ml)	frasco x 100 ml