



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Influencia del tamaño del cuerpo lúteo, sobre la tasa de preñez, en vacas de la raza brahman, sincronizadas a tiempo fijo, para transferencias de embriones producidos *In vitro*”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

Sergio Javier Rodríguez Rodríguez

ASESORES:

M. en C. TRINIDAD BELTRÁN LEÓN
DVM, PhD LUIZ TONISSI NASSER

REVISORES:

MVZ. BULMARO VALDEZ RAMIREZ
M en CARN. ARTURO VICTOR GOMEZ GONZALEZ



TOLUCA, MÉXICO, MAYO DE 2017.

RESUMEN.

El presente trabajo, tuvo como objetivo evaluar la influencia del tamaño del cuerpo lúteo de hembras bovinas sincronizadas para transferencia de embriones *in vitro*. Para ello, se utilizaron 216 hembras receptoras de la raza Brahman, con un nivel de confianza del 95% y un error del 5%, empleándose un diseño completamente al azar con 6 grupos de trabajo. El estudio se desarrolló en la Hacienda La Barrera, en el distrito de Tonosí, provincia de Los Santos – República de Panamá. Todas las hembras receptoras fueron sometidas a un programa de sincronización de estros a base de dispositivos intravaginales de progesterona de 1 gr, posterior a esto a los 7 días se retiró del dispositivo y se realizaron las transferencias de embriones *in vitro* en el día 17 del protocolo hormonal. Se determinó el diámetro del cuerpo lúteo (CL) al momento de la transferencia embrionaria, clasificándose en grado 4: 16mm, grado 3: 18mm, Grado 2: 20mm y Grado 1: 22mm. Se obtuvo un 43,5% de tasas de preñez total en el estudio en las hembras receptoras de embriones. En los resultados, se evidencio que las mayores tasas de preñez (65,6%) se reportaron, cuando el CL presentaba un diámetro de 22mm, contrario a esto, cuando el CL poseía un diámetro 16 mm, las tasas de preñez fueron del 20%. Se observó que a mayor diámetro del cuerpo lúteo en las receptoras de embriones *in vitro*, favoreció las tasas de preñez, indicando la influencia del tamaño del CL sobre la preñez en las hembras bovinas.

ÍNDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Fisiología del sistema reproductor de la vaca	5
2.1.1. Ovarios.....	5
2.1.2. Formación de folículos	6
2.1.3. Foliculogénesis.....	6
2.1.4. Ovogénesis	7
2.1.5. Cuerpo hemorrágico	7
2.1.6. Cuerpo lúteo	8
2.1.7. Cuerpo albicans.....	10
2.1.8. Ciclo estral.....	10
2.1.9. Etapas del ciclo estral.....	10
2.2. Fases del ciclo estral.....	13
2.3. Dinámica folicular.....	14
2.4. Fisiología reproductiva en bos taurus y bos indicus	17
2.5. Tratamientos para sincronización de celo.	18
2.7. Técnica de transferencia no quirúrgica transcervical.	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS.....	31
5.1. Objetivo General.....	31
5.2. Objetivos Específicos.....	31
6. MATERIALES.....	32
6.1. Equipo utilizado para la sincronización de estros:.....	32
6.2. Equipo de retiro de los dispositivos de progesterona (protocolo de sincronización de estros: 33	
6.3. Equipo para la aplicación de la aspiración guiada por ultrasonido (OPU).....	33
6.4. Equipo utilizado en búsqueda y selección de ovocitos:.....	34
6.5. Material y Equipo para la transferencia de embriones (TE):	35
7. MÉTODO.....	37
8. LÍMITE DE ESPACIO.....	43
9. LÍMITE DE TIEMPO.....	46

10. RESULTADOS	47
11. DISCUSIÓN	63
11.1. Porcentaje de preñez de las hembras receptoras del estudio	63
11.2. Clasificación de diámetro de estructuras ováricas (CL) de las hembras del estudio	63
12. CONCLUSIÓN	67
13. SUGERENCIAS	68
14. LITERATURA CITADA	69

ÍNDICE DE FIGURAS.

ILUSTRACIÓN 1 PAJUELA FRANCESA	41
ILUSTRACIÓN 2 MAPA DE LOCALIZACIÓN DE LA HACIENDA LA BARRERA, DISTRITO DE TONOSI, PROV. LOS SANTOS, REP. DE PANAMÁ	45

ÍNDICE DE CUADROS.

CUADRO 1. PROTOCOLO UTILIZADO PARA LAS VACAS RECEPTORAS DE EMBRIONES IN VITRO.....	40
CUADRO 2. REGISTRO DE PROTOCOLO APLICADO POR FECHA.....	47

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1 TASA DE PREÑEZ EN RECEPTORAS DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO Y EL DIÁMETRO DEL CUERPO LÚTEO. ...5	
TABLA 2 EFECTO DEL TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN VACAS BRAHMAN TRANSFERIDAS CON EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO. GRUPO A	47
TABLA 3 EFECTO DEL TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN VACAS BRAHMAN TRANSFERIDAS CON EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO. GRUPO B	49
TABLA 4 EFECTO DEL TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN VACAS BRAHMAN TRANSFERIDAS CON EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO. GRUPO C	51
TABLA 5 EFECTO DEL TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN VACAS BRAHMAN TRANSFERIDAS CON EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO. GRUPO D	53
TABLA 6 EFECTO DEL TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN VACAS BRAHMAN TRANSFERIDAS CON EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO. GRUPO E	55
TABLA 7 EFECTO DEL TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN VACAS BRAHMAN TRANSFERIDAS CON EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO. GRUPO F	57
TABLA 8 EFECTO DEL TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN VACAS BRAHMAN TRANSFERIDAS CON EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO. TOTAL DE HEMBRAS ANALIZADAS	59
TABLA 9 TABLA DE CONTINGENCIA.....	61
TABLA 10 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS	61

ÍNDICE DE GRAFICAS.

GRAFICA 1. GRUPO A. MUESTRA DE 35 EJEMPLARES.	48
GRAFICA 2. GRUPO B. MUESTRA DE 37 EJEMPLARES.	50
GRAFICA 3. GRUPO C. MUESTRA DE 32 EJEMPLARES.	52
GRAFICA 4. GRUPO D. MUESTRA DE 36 EJEMPLARES.	54
GRAFICA 5. GRUPO E. MUESTRA DE 29 EJEMPLARES.	56
GRAFICA 6. GRUPO F. MUESTRA DE 36 EJEMPLARES.	58
GRAFICA 7. GRUPOS TOTALES.	60

1. INTRODUCCIÓN.

La situación actual de la ganadería, agravada por los altos costos de producción y los bajos precios pagados a los ganaderos, exige al productor panameño mayor eficiencia para garantizar el retorno económico (MIDA, 2014) y es la eficacia reproductiva uno de los principales factores que contribuyen a mejorar las ganancias dentro de la finca y por ende la satisfacción de la demanda alimentaria de la población. (Mahecha, et al; 2002)

Es por ello que se han desarrollado en los últimos años numerosas técnicas reproductivas, basadas en la biotecnología, con el fin de lograr mayor rentabilidad en este tipo de negocio (Restrepo, 2008)

Las biotecnologías reproductivas en bovinos, han venido en aumento en diferentes países; Panamá no ha sido indiferente a este tipo de biotecnologías en bovinos. Desde la inseminación artificial, hasta la transferencia embrionaria con embriones producidos sea *in vivo* o *in vitro*; la cual es una técnica reproductiva biotecnológica, que permite aumentar la descendencia de animales de alto valor genético (Bó, 1996; Vasconcelos, 2006) y además ha tenido una gran aceptación en el mejoramiento reproductivo en las ganaderías. Después de la implementación de la inseminación artificial, la transferencia de embriones (TE) se ha convertido en la herramienta más poderosa para el mejoramiento genético de los animales.

Varios países han incorporado la transferencia de embriones dentro de los programas de progenie como ayuda para el mejoramiento genético en el ganado de carne y leche, ya que las ventajas que ofrece son importantes, como el incremento de la producción de hembras genéticamente superiores, maximizar el

uso de semen de alto valor genético, planificaciones de cruzamientos y otras ventajas que ofrece la transferencia de embriones (Tríbulo et al., 1998).

La optimización de la eficiencia reproductiva es uno de los principales factores que contribuyen para mejorar el retorno económico de una explotación ganadera. Sin lugar a dudas la tasa de preñez y sobre todo su distribución, tienen un impacto muy importante sobre la ecuación económica de un establecimiento de cría. Lograr un ternero por vaca por año en un sistema de producción bovina sería la meta, todo esto sin el uso de biotecnología, cabe señalar que al utilizar la transferencia embrionaria como una herramienta biotecnológica, nuestra meta debería estar guiada a tener disponibles la mayor cantidad y la mejor calidad de receptoras para así asegurar mayores porcentajes de preñez y con ello obtendríamos varios descendientes con un alto valor genético.

Los resultados positivos, representados en el número de gestaciones tras la aplicación de dicha técnica, se ven afectados por la falta de calidad de las hembras receptoras disponibles, las cuales van a recibir un embrión alogénico en su útero desempeñándose como “hembras vientre” para permitir el desarrollo embrionario hasta que la preñez llegue a término. Además de una serie de parámetros que deben ser evaluados en este tipo de hembras, es de importancia hacer un seguimiento de las estructuras presentes en el ovario durante la etapa previa a la transferencia del embrión, así como durante el control del ciclo estral (sincronización del estro). En el ovario, un buen desarrollo folicular va a ser determinante para permitir la formación de un cuerpo lúteo que genere concentraciones plasmáticas de progesterona suficientes para ofrecer un medio ambiente uterino adecuado y de esta forma favorecer el desarrollo embrionario (Kastelic, 1990; Vasconcelos, 2001; Sartori, 2002; Gonella, 2010).

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

Oyuela (2009) relacionó la importancia del diámetro del cuerpo lúteo y el efecto positivo sobre tasa de gestación, similares trabajos fueron reportados por Duica (2010). Las tasas de transferencia de embriones, han sido reportado por diversos autores, como Nogueira *et al* (2012), indicaron que con embriones *in vitro* en su trabajo obtuvieron un porcentaje de preñez del 44,1% (67/152), igualmente, Siqueira *et al* (2009), reportaron porcentajes del 58.8% preñez. Gonella-Diaza *et al* (2013) obtuvieron tasas de preñez del 31,4%, Benyei *et al.* (2006) un 34,2% y Aller *et al.* (2000), un 31,5% de preñez en bovinos por medio de transferencia de embriones *in vitro*.

Ortiz, (2001), demostró la relaciona el diámetro del cuerpo lúteo con las tasas de preñez en transferencia de embriones, en esta investigación obtuvo tasas de preñez, relacionadas de la siguiente forma, cuerpo lúteo grado 1 (17 mm) de 18 transferencias, 5 preñadas (27,7%); cuerpo lúteo grado 2 (14 mm) de 25 transferencias, 9 preñadas (36%); cuerpo lúteo grado 3 de 14 transferencias, 1 preñez (7,1%).

Duran y Ortiz (2010), evaluaron tasas de preñez según el tamaño del CL, e indicaron que, los CL1 (52,4%), con CL2 (39,0%) y con CL3 (15,9%). De igual forma Baruselli *et al.*, (2001), indicaron que para receptoras de embriones bovinos (*Bos indicus* x *Bos taurus*) las tasas de preñez, con relación a la clasificación del cuerpo lúteo fueron, del 58,4% (47/77) con CL1; 41,5% (17/41) con CL2, y 31,8% (7/22) con CL3 ($P < 0,05$). Gonella-Diaza *et al* (2013) indicaron tasas de preñez altas para novillas que poseían CL 24 mm (39.7%), CL de 22 mm (33.7%), y tasa de preñez en novillas con los diámetros de CL of 14 mm (24.2%). ($P < 0.01$).

Se puede apreciar la poca regularidad de las tasas de preñez en los diferentes trabajos expuestos anteriormente de igual forma se reportan pocos trabajos en animales de la raza *Bos indicus*, por tanto se hace fundamental realizar trabajos

en las animales Brahmán, debido es una de las razas con mayor difusión a nivel de América latina, y puntalmente en Panamá, donde se realizó, el actual trabajo.

El procedimiento general para selección de receptoras, es determinar la presencia de un cuerpo lúteo funcional (de acuerdo a su diámetro) y posteriormente realizar una transferencia embrionaria, en el cuerno ipsilateral, de aquí la importancia del diámetro del CL, lo cual ha sido, utilizado para seleccionar las receptoras de embriones (Demetrio *et al*, 2007; Duica *et al.*, 2007).

A pesar de lo anterior, los resultados de varios estudios son contradictorios, algunos reportaron que cuando el diámetro lúteo aumento, la tasa de preñez también aumentó (Baruselli *et al*, 2001; Duica *et al*, 2007), pero otros estudios no encontraron evidencia estadística para indicar este hallazgo. Cutini *et al* (2000) considera que la calidad del cuerpo lúteo (tamaño y consistencia) es un factor asociado el éxito en la selección de las receptoras, sin embargo Lagunes (2014) indica que no es posible establecer una relación entre la calidad del CL y la preñez. Gonella-Diaza *et al.* 2013, indicaron diferentes diámetros de cuerpos lúteos y lo relacionaron con las tasas de gestación en bovinos. (Tabla 1)

Sin embargo si se comparan dos hembras receptoras bajo condiciones similares, la hembra que posea un mayor diámetro lúteal, posee concentraciones de progesterona mayores (Kerbler *et al.*, 1997; Mann, 2009) y por lo tanto un ambiente uterino que podrá favorecer mejor a la implantación embrionaria (Lonergan *et al.*, 2007; Okumu *et al.*, 2010). Debido a que la progesterona juega un papel importante durante la gestación temprana, y la nutrición histotrófica al embrión (Gray *et al*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Lonergan, 2011). Siendo esta nutrición importante para el desarrollo, migración e implantación embrionaria ya que proporciona factores de crecimiento, aminoácidos, e hidratos de carbono,

entre otras sustancias necesarias (Barnes, 2000; Spencer et al, 2004; Morris y Diskin, 2008).

Tabla 1 Tasa de preñez en receptoras después de la transferencia de embriones producidos in vitro y el diámetro del cuerpo lúteo.

DIÁMETRO DEL CUERPO LÚTEO	TASAS DE PREÑEZ
<14 mm	24.18
14 mm	29.53
16 mm	30.14
18 mm	31.08
20 mm	31.21
22 mm	33.72
24 mm	31.49
>24 mm	39.73

Fuente: Gonella-Diaza et al. 2013.

2.1. Fisiología del sistema reproductor de la vaca

2.1.1. Ovarios

Es el órgano primario de la reproducción en la hembra. Los ovarios, uno para cada cuerno, pueden ser considerados de naturaleza endocrina y citógena porque producen hormonas, las cuales son vertidas al torrente circulatorio y también porque producen óvulos. El tamaño del ovario varía con el ciclo estral. Generalmente son de forma ovoide y su tamaño promedio es de 3.5 x 2.5 x 1.5 cm (Getty, 1982), los ovarios de la vaca son más pequeños que los de la yegua. Miden normalmente de 3,5 a 4,0 cm de longitud, 2,5 cm de ancho y tienen alrededor de 1,5 cm de grueso en su porción mayor; el peso de unos 15 a 20g.

Su interior está dividido en dos capas. La médula o porción central del ovario es rica en vasos sanguíneos, nervios y la corteza o porción externa donde se encuentran los folículos primarios. En cada folículo se encuentra una célula u óvulo rodeada de células foliculares. Es importante recordar que en cada ovario hay alrededor de 200,000 folículos primarios, en estado de reposo, es decir folículos jóvenes en desarrollo (Hafez, 1989)

2.1.2. Formación de folículos

En la hembra bovina, en estado de pubertad, el hipotálamo, produce el factor de liberación de las hormonas (FSH y LH), ésta va a la hipófisis permitiendo que se libere la hormona estimulante (FSH), que por vía sanguínea llega al ovario, en donde hace que el folículo más superficial y apto aumente de tamaño rápidamente, con proliferación de las células de la teca y aumento de la secreción de estrógenos. El crecimiento del folículo se efectúa en dos a tres días anteriores al celo, simultáneamente los niveles altos de estrógeno inhiben al hipotálamo e hipófisis en la producción de FSH.

Al inhibirse la producción de FSH por la acción estrogénica, el hipotálamo produce el factor de liberación de la hormona luteinizante (LH) la que termina la maduración folicular a folículos mayores a 8.0 mm que produce dehiscencia del folículo hacia el infundíbulo de las trompas de falopio. Cuando sale el óvulo, disminuyen los estrógenos secretados por la teca (Ptaszynska, 2007).

2.1.3. Foliculogénesis

Villavicencio y Méndez (2007), Pérez y Rodríguez (2002), entre otros autores, describen la Foliculogénesis como el desarrollo folicular (reclutamiento, selección, crecimiento, maduración y ovulación durante el ciclo estral de la hembra) que incluye señales endócrinas, parácrinas y autócrinas dentro del ovario y un

intercambio de señales endocrinas entre los ovarios y la hipófisis, y envuelve una combinación de interacciones entre hormonas, factores de crecimiento, sistemas de comunicación celular y genes .

2.1.4. Ovogénesis

Se denomina ovogénesis al proceso de formación de los ovocitos. La ovogénesis es la gametogénesis femenina, es decir, es el desarrollo y diferenciación del gameto femenino u óvulo mediante una división meiótica. La ovogénesis involucra etapas como la multiplicación de los oogonios, formación de ovocitos y folículos primarios, foliculogénesis y crecimiento del ovocito, maduración del ovocito y ovulación. (Hafez, 1989).

2.1.5. Cuerpo hemorrágico

El folículo lleno de sangre y ya desprovisto del huevo se convierte en cuerpo hemorrágico y sirve como medio nutritivo para la proliferación de las células lúteas cuyo crecimiento es uno de los más rápidos (McDonald, 1981).

Después de la ovulación sigue la producción de LH y en la fosa de ovulación del ovario se comienza a formar un cuerpo hemorrágico por luteinización de las células de la granulosa. Este cuerpo hemorrágico ya está formado hacia el día tercero del ciclo y comienza a producir crecientes niveles de progesterona.

Al tiempo en que el folículo ovárico aumenta de volumen, debido principalmente al líquido que se forma en su interior, este ejerce presión sobre la túnica albugínea, reduciendo la pared ovárica en un punto (folículo pre- ovulatorio) donde salen proyectados el líquido y el óvulo, que caen en la cavidad peritoneal cerca del infundíbulo del oviducto y con esto se completa el proceso de la ovulación (Hafez, 1989).

Por otro lado Ptaszynska (2007), nos aporta de que existen diferencias en el mecanismo de la ovulación, siendo la ovulación espontánea la que ocurre en la mayoría de los animales, pero que el caso de la gata, la coneja y la camella, la misma es inducida durante el coito por estimulación a receptores que se hallan en la vagina y el cérvix.

2.1.6. Cuerpo lúteo

Hacia el quinto día del ciclo se ha formado el cuerpo hemorrágico que en el día séptimo ya es un cuerpo lúteo con plena producción de progesterona. Luego de la formación del cuerpo hemorrágico las células epiteliales que tapizan la cavidad folicular comienzan a multiplicarse bajo el fluido de la LH (hormona luteinizante) del lóbulo anterior de la hipófisis. Con esta multiplicación se forma el cuerpo lúteo (cuerpo amarillo), el cual, en muchas especies se proyecta en la superficie del ovario.

El cuerpo lúteo se forma con células luteales grandes (anteriormente células de la granulosa) y células luteales pequeñas (teca). El cuerpo lúteo permanece hasta el día 17, al no producirse preñez. El nivel de progesterona sanguínea inhibe al hipotálamo e hipófisis en la producción de LH, si hay preñez, el cuerpo lúteo y la producción de progesterona persisten durante dicho estado (Hafez, 1989).

El cuerpo lúteo funciona a manera de una glándula endocrina transitoria, altamente irrigada, cuya principal acción es la producción de la hormona progesterona, la que favorece la formación de un adecuado medio ambiente uterino, permitiendo que ocurran las primeras etapas del desarrollo embrionario y después desencadenar el reconocimiento materno de la gestación; al no producirse ésta interacción entre la madre y el embrión, se da paso a un nuevo ciclo estral debido a la activación de los mecanismos luteolíticos, que generan la involución tanto estructural como funcional del cuerpo lúteo, permitiendo una nueva etapa de dominancia folicular así como la siguiente ovulación (Duica, 2010).

Una vez liberado el oocito y el líquido que se encontraban en el antro folicular, se inicia una llegada masiva de sangre al sitio de ovulación; estos cambios hemodinámicos locales intervienen en la remodelación que ocurre durante la transición de estructuras ováricas, ya que al formarse un cuerpo lúteo va a producirse una importante neovascularización (angiogénesis) y una diferenciación de las células que estaban presentes en el folículo (luteinización), durante el pico de LH y la formación temprana del cuerpo lúteo. Al inicio de la luteinización las células de la teca folicular sufren un proceso de hiperplasia e hipertrofia, para generar las células lúteas pequeñas; mientras que las células de la granulosa folicular van a dar paso a las células lúteas grandes. El cuerpo lúteo bovino está compuesto por células lúteas grandes, pequeñas, varios tipos de células endoteliales, musculatura lisa, macrófagos, leucocitos y ocasionalmente algunas células plasmáticas, cuya función es la secreción de progesterona, y en pequeñas cantidades, estradiol, prostaglandinas y hormonas peptídicas, como relaxina, oxitocina, neurofisisina-I, vasopresina e inhibina) (Duica, 2010).

Durante la etapa final del desarrollo folicular se generan cambios hemodinámicos que disminuyen el aporte sanguíneo ovárico pos-ovulación; entre 2 y 5 días después de la ovulación el flujo sanguíneo se incrementa notoriamente correlacionándose con el aumento del volumen lúteal y las concentraciones sanguíneas de progesterona debido a la angiogénesis que se está produciendo en el cuerpo lúteo, lo que genera la diferenciación de las células foliculares en células luteales (Duica, 2010).

Una vez establecidas las células lúteas grandes y pequeñas se crean uniones intercelulares que permiten el intercambio de elementos entre las células, importantes para la regulación del crecimiento, diferenciación y regresión lútea; estos canales son inducidos por la acción de las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH), así como de sus receptores. Las células lúteas ya formadas, incrementan

su contenido de lípidos, colesterol y esteroides; pero también incrementan la actividad de las enzimas 5- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, así como de la succinato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, isocitrato-deshidrogenasa, malato-deshidrogenasa y fosfatasa, para poder efectuar la biosíntesis hormonal durante la fase luteal (Duica, 2010).

2.1.7. Cuerpo albicans

Al no haber preñez, alrededor de los 17 días del ciclo, el útero produce prostaglandina (PGF_{2a}) llamada factor luteolítico, el cual llega al ovario para producir la degeneración del cuerpo lúteo, que se completa en el ciclo siguiente, llamado entonces así cuerpo blanco o cuerpo albicans que es una cicatriz del cuerpo lúteo en la superficie del ovario, palpable como una rugosidad (McDonald, 1981).

2.1.8. Ciclo estral

La vaca entra en celo a intervalos regulares. El ciclo estral va desde el principio de un periodo de celo hasta el principio del siguiente celo. El tiempo que transcurre entre estos dos periodos se denomina ciclo estral y varía entre 18 y 24 días con un promedio de 21 días. Es controlado directamente por las hormonas secretadas en el lóbulo anterior de la glándula pituitaria (hipófisis) (Hafez, 1989).

2.1.9. Etapas del ciclo estral

Las diferentes etapas del ciclo se fundamentan en estructuras que se encuentran en los ovarios y en las relaciones hormonales que existen en la vaca, las etapas son: El estro, metaestro, diestro y proestro (Galina y Saltiel, 1995).

2.1.9.1. Proestro

Bajo el efecto de la hormona estimulante del folículo (FSH) y probablemente de la hormona luteotrófica (LH) del lóbulo anterior de la glándula pituitaria, las cuales hacen crecer y madurar el folículo, el ovario aumenta la producción de sus hormonas estrogénicas y algo de progesterona; lo cual produce un aumento en el

tamaño de la vulva, vagina, útero y oviducto. Esta primera fase (proestro) del ciclo estral tiene una duración de tres a cuatro días. Esta fase sigue a la desaparición del cuerpo lúteo, con lo que disminuye los valores de progesterona (Urroz, 2000). También es durante ésta etapa que los folículos son reclutados para la ovulación y el tracto reproductivo de la hembra se prepara para la cópula (Callejas, 2010).

Las hormonas estrogénicas producidas en el folículo ovárico durante su crecimiento y maduración; pasan a la corriente sanguínea estimulando la vascularización y crecimiento celular de los genitales en preparación del estro y la consiguiente preñez (Hafez, 1989).

2.1.9.2. Estro

El estro o celo es el periodo en que la hembra acepta sexualmente el macho, tiene una duración de 18 horas pero puede variar entre seis y 30 horas. Este periodo es el más importante para inseminar a la hembra o poner el reproductor. Si no se detecta esta fase oportunamente en la vaca es difícil que ocurra la preñez, lo cual significa días perdidos en la vida productiva del animal y pérdidas en la economía de la explotación ganadera (Hafez, 1989).

Durante el estro, el organismo de la hembra está bajo la acción de los estrógenos y hormonas femeninas que hacen cambiar el comportamiento del animal, disminuyendo la producción de leche, se encuentra nerviosa y alerta, monta a otras vacas y se deja montar, a esta etapa Urroz (2000) y Noakes (1997), la describen como el periodo de receptibilidad sexual.

Los signos de celo varían tanto en intensidad como en duración. Así, mientras unas vacas pueden presentar un celo largo y fuerte otras lo pueden presentar largo y débil, otras corto y fuerte y aún otras pueden presentarlo corto y débil.

En el ovario, antes de la ovulación, el folículo de Graff es grande, túrgido y contiene el óvulo que sufre proceso de maduración. La ovulación ocurre entre 10 y

14 horas después de desaparecer en la vaca los signos externos de celo y el óvulo se aloja en el oviducto.

El estrógeno es la hormona dominante durante ésta etapa. No solo induce alteraciones comportamentales sino que también causa cambios en el tracto reproductivo (Callejas, 2010).

2.1.9.3. Metaestro

En este periodo las hormonas tales como el estrógeno y la progesterona son relativamente bajas al inicio del metaestro, pero al final la P4 comienza a aumentar con la formación del cuerpo lúteo (CL). El nuevo folículo ovulado sufre remodelación celular y estructural para la formación de una glándula intraovárica llamada CL. Ésta transición celular es llamada luteinización. Durante el metaestro la progesterona secretada es detectada tempranamente después de la ovulación. Sin embargo se requiere 2 a 5 días después de la ovulación para que el CL produzca cantidades suficientes de progesterona (Callejas, 2010).

2.1.9.4. Diestro.

El diestro es un periodo de reposo o quietud entre ciclos estrales tiene una duración de nueve a 12 días antes de empezar una nueva fase de proestro. Durante este periodo, el cuerpo lúteo está completamente desarrollado y tiene una marcada influencia sobre el útero. Si ocurrió la preñez, este fenómeno se prolonga a través de toda la gestación y el cuerpo lúteo permanece intacto por todo el período. Si el ovocito no fue fertilizado, y la preñez no llegó a ocurrir, el cuerpo lúteo regresa (se destruye por acción de la PGF2 α) en nueve a 12 días para empezar el nuevo ciclo estral (Frandsen, 1976 y Urroz, 2000). Por otro lado es el período de máxima función lútea, donde el CL está produciendo la progesterona en altas concentraciones. El Diestro es la etapa más larga de ciclo estral y es el período de tiempo en que al CL es totalmente funcional y la secreción de progesterona es alta. Ésta termina cuando el CL es destruido (luteólisis). Altos

niveles de progesterona preparan el útero para un temprano desarrollo embrionario y eventual implantación. La duración del Diestro está relacionada con la duración de tiempo que permanezca el CL funcional (Callejas, 2010).

2.2. Fases del ciclo estral.

2.2.1. Fase folicular.

La fase folicular según Hafez (1989), es el periodo que va desde la formación de folículos con andro hasta la ovulación.

No en tanto el periodo de la maduración folicular, del celo y de la ovulación, caracterizado por la producción de estradiol, recibe el nombre de fase folicular del ciclo (Ptaszynska, 2007).

Fase que ocurre dentro del ciclo estral como un evento que se expresa como un crecimiento continuo y regresión de folículos, dándose estos de una a tres oleadas por efectos de la hormona FSH (hormona folículo estimulante) y regresión de los mismos por altos niveles sanguíneos de la hormona progesterona (P4) procedente de un cuerpo lúteo activo.

El número de oleadas también van a definir el tiempo de duración del ciclo estral. El ciclo estral es más largo en hembras con tres oleadas que en aquellas con dos, debido a que en las primeras (tres oleadas) se prolonga la fase lútea. Si la función lútea declina antes, el folículo más grande de la segunda oleada alcanza su máximo diámetro, permanece viable y se transforma en un folículo ovulatorio.

2.2.2. Fase luteal

Ptaszynska (2007), define esta fase como, la fase de dominio de la progesterona, es decir desde la ovulación hasta la luteolisis.

En presencia de un cuerpo lúteo podemos decir que la hembra se encuentra fisiológicamente dentro del ciclo estral en la fase luteal, el cual persiste por

alrededor de 15 días del ciclo, hasta el momento que haya o no reconocimiento materno de preñez; de no existir reconocimiento de preñez, se libera a nivel del endometrio uterino la hormona conocida como prostaglandina la cual causa la lisis del cuerpo lúteo causando una regresión del mismo para dar inicio a un nuevo ciclo estral.

2.2.3. Fase preovulatoria

Durante este período se producen importantes fenómenos: inicio del celo, onda preovulatoria de gonadotrofinas y ovulación. El intervalo entre el inicio de la luteolisis y el comienzo del celo es de 58-60 horas aproximadamente. Los niveles de estradiol aumentan desde la regresión luteal hasta alcanzar niveles máximos el día previo al inicio del celo. Dicha elevación del estradiol provoca el comportamiento propio del celo e induce la descarga preovulatoria de LH. Esta tiene una duración de 6-10 h, se inicia junto con el celo y alcanza su valor máximo (pico) cuatro a cinco horas más tarde. Durante el pico preovulatorio, la descarga de LH sigue un patrón pulsátil (Bó, 2000). Luego de todos estos comportamientos hormonales entramos en la fase ovulatoria, en donde Ptaszynska (2007), nos describe que la ovulación se da unas 30 horas después del inicio del celo (celo) por efecto de la liberación de un pico de la hormona LH.

2.3. Dinámica folicular

La duración del ciclo estral de los bovinos varía entre 17 y 25 días, con semejanzas entre las hembras *Bos indicus* y *Bos taurus*. Durante el ciclo estral, el desarrollo folicular se presenta como una secuencia dinámica de eventos fisiológicos y endocrinos que involucran el crecimiento o la atresia (ausencia congénita u obstrucción de un conducto o abertura corporal) de los folículos antrales, con movimientos que se asemejan a ondas (Nasser, 2006).

Esta teoría de las ondas foliculares ha sido propuesta por Rajakoski (1960), quien realizó estudios histológicos en ovarios obtenidos en frigoríficos. Con base en las

observaciones realizadas, el autor sugirió la existencia de dos ondas de desarrollo de folículos antrales durante el ciclo estral, cada una presentando un folículo que crecía hasta alcanzar un diámetro preovulatorio.

Con el uso de ultrasonografía, técnica de evaluación no invasiva en tiempo real, otros estudios comprobaron la teoría de que el crecimiento de los folículos se daba en forma de ondas, y verificaron que cada ciclo tenía de dos a cuatro ondas de crecimiento folicular. Con ese tipo de examen fue posible analizar la dinámica folicular mediante la correlación temporal entre los eventos endocrinos y la aparición de estructuras ováricas no correspondientes al ciclo estral (Nasser, 2006).

La primera onda de crecimiento folicular inicialmente identificada el día de la ovulación (Día 0) es reconocida por el equipo de ultrasonografía gracias a la visualización de un grupo de folículos antrales (3 a 5 mm.) como respuesta a las gonadotropinas. Esa etapa, denominada fase de reclutamiento, está asociada a la elevación de las concentraciones plasmáticas de la hormona folículo estimulante FSH. La concentración de FSH alcanza su pico máximo cuando el folículo mayor, denominado folículo dominante (FD), alcanza un tamaño de 4 a 5 mm. El inicio de esta fase de crecimiento del FD y de todos los demás folículos –identificados como subordinados ocurre gracias a la FSH circulante. A partir de este momento, el FD crece en forma lineal (fase de crecimiento) por seis días, y las concentraciones periféricas de estrógenos y andrógenos aumentan (Nasser, 2006).

Alrededor del día 3, y con diámetro de aproximadamente 8,5 mm., el FD adquiere receptores para la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa – momento denominado desvío- y pasa entonces a ejercer su dominancia. De igual manera, con niveles basales de FSH, el FD alcanza su punto de desvío gracias al efecto positivo de la LH, y entonces su crecimiento es limitado por la progesterona

(P4) secretada por el cuerpo lúteo, que promueve la disminución de la frecuencia y aumenta la amplitud de los pulsos de LH. El aumento de los receptores para LH capacita a los folículos para responder a las altas amplitudes de pulsos de esas hormonas y continuar creciendo.

Para alcanzar la cima, el FD entra en una fase denominada estática, en la cual ejerce su dominancia sobre los folículos subordinados –causando la atresia de éstos por más de seis días. Después de un período de dominancia, y con la secreción continua de los andrógenos producidos por el FD, ocurre un nuevo pico de FSH. Ese pico es responsable del inicio de una nueva onda de crecimiento folicular, que hace que el folículo dominante de la primera onda entre en atresia. Ese mecanismo puede ocurrir dos, tres o cuatro veces en un mismo intervalo entre ciclos estrales (Nasser, 2006).

Los elementos involucrados en el mecanismo que rige la dominancia folicular aún no son suficientemente claros. De acuerdo con Fortune (1993), por un mecanismo de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipofisario, la presencia de altas concentraciones de estradiol y de inhibina producidas por el FD, provocan una disminución de las concentraciones plasmáticas de FSH a niveles basales, bloqueando así el crecimiento de los folículos dependientes de la FSH y acarreado su atresia folicular.

Fortune, Rivera y Yang (2004) demostraron la importancia del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I) como mecanismo de dominancia. Durante el desarrollo folicular, parte de las acciones de IGF-I están comprometidas en la estimulación de células de la granulosa, en la proliferación de las células teca y en la esteroideogénesis, responsables de la biodisponibilidad de receptores para FSH. Esa biodisponibilidad de receptores para FSH ya está presente en mayor cantidad en el folículo dominante desde el momento en que éste es

identificado como FD, lo que demuestra su actuación de dominante en concordancia con la emergencia de la onda folicular.

El proceso de crecimiento y de atresia de los folículos perdura siempre y cuando el cuerpo lúteo sea funcional y esté produciendo progesterona, lo mismo que ocurre durante la gestación. Cuando no ha habido un reconocimiento materno de la gestación, determinado principalmente por la producción de interferón trofoblástico, y finalizado por las células del endometrio, ocurre el proceso de luteólisis. El momento de la regresión del cuerpo lúteo, determina si el FD será un folículo ovulatorio. El crecimiento del FD promueve el aumento de las concentraciones de estrógenos, el cual desencadena el mecanismo de retroalimentación positiva para la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y el consecuente pico de LH, promoviendo la ovulación (Nasser, 2006).

2.4. Fisiología reproductiva en *Bos taurus* y *Bos indicus*

Los estudios indican que características como el número de ondas por ciclo, el crecimiento folicular y la dominancia, son similares para las hembras *Bos taurus* y *Bos indicus*.

A pesar de las semejanzas en el patrón de crecimiento folicular, se han reportado diferencias morfológicas y endocrinas. Los animales *Bos indicus* presentan diámetros máximos de FD entre 10 y 12 mm y de CL entre 17 y 21 mm menores que los característicos en *Bos taurus*, cuyos diámetros son: FD, 14 a 20 mm.y CL, 20 a 30 mm. La diferencia del tamaño del cuerpo lúteo tiene una implicación práctica para los animales, dado que dificulta su identificación vía palpación rectal. Ya se describió que la cantidad de progesterona presente en el cuerpo lúteo de animales *Bos indicus*, es menor que aquélla observada en animales *Bos taurus*, lo que sugiere una disminución de los niveles circulantes de progesterona en éstos últimos (Nasser, 2006).

Randel (1989) expuso la hipótesis de que un menor tamaño de cuerpo lúteo en los animales *Bos indicus* sería el resultado de una menor respuesta a los estrógenos, menor pico preovulatorio de LH y diferencias endocrinas relacionadas con los eventos que culminan con la ovulación.

Con relación a la población folicular, los ovarios de los animales *Bos indicus* presentan mayor cantidad de folículos menores de 5 mm, emergiendo al inicio de la onda folicular, con respecto a los animales *Bos taurus* (Nasser, 2006).

2.5. Tratamientos para sincronización de celo.

La transferencia embrionaria en ganado bovino ha estado comercialmente disponible por más de tres décadas. Actualmente, esta técnica es extensamente utilizada en todo el mundo. El éxito de un programa de transferencia de embriones se mide por el número de terneros que nacen vivos por hembra donante en un determinado lapso de tiempo. Esto está influenciado por los factores relacionados con el número de ovulaciones, la fertilización y viabilidad de los embriones y aquellos relacionados con el manejo de las donantes y receptoras (Armstrong, 1993). Uno de los puntos críticos de la técnica de transferencia de embriones es el alto costo por receptora preñada (Beal and Hinshaw, 2000). Las tasas de concepción varían entre un 40 a 70% dependiendo del uso de embriones frescos o congelados (Callesen *et al.*, 1992, Lohouiset *et al.*, 1993, Stroud y Hasler 2006).

Uno de los factores que ha impedido la utilización masiva de la técnica de transferencia de embriones es la detección de celos, principalmente en el ganado *Bos indicus* (Bóet *al.*, 2006). El desarrollo de protocolos efectivos de sincronización de la ovulación para evitar la detección de celos en programas de inseminación artificial (IA), conocidos como programas de IA a Tiempo Fijo (IATF), ha permitido la inseminación masiva de vacas y vaquillonas (Bóet *al.*, 2002b, 2002c). Esto ha traído como consecuencia el desarrollo de métodos de sincronización de la ovulación para facilitar la transferencia de embriones en forma sistemática, o

también llamada transferencia embrionaria a tiempo fijo (TETF) (Baruselli *et al.*, 2005, Bó *et al.*, 2002a, Beal y Hinshaw, 2000, Mapletoft *et al.*, 2003). Para esto es necesario controlar el desarrollo folicular y la ovulación.

2.5.1. Utilización de eCG en Programas de Transferencia de Embriones a Tiempo Fijo con la Utilización de Dispositivos con Progesterona.

Una alternativa para aumentar los niveles circulantes de progesterona en receptoras de embriones transferidas en tiempo fijo es mediante la utilización de gonadotropina corionica equina (eCG) durante el tratamiento de sincronización de la receptora. El tratamiento utilizado para la TETF consiste en administrar 2 mg de benzoato de estradiol (BE) por vía intramuscular (IM) junto con la inserción del dispositivo con progestágeno, en lo que nosotros denominamos el Día 0 del tratamiento. En el Día 5 se coloca una dosis lúteolítica de PGF de 150ug IM. y se aplican 400 IU de eCG vía IM., en el Día 8 se extrae el dispositivo y 24 h después se administra 1 mg de BE IM En el Día 17, se realiza TETF a todas las receptoras que tienen un CL (Bó *et al.*, 2002a, 2004).

2.5.2. Protocolo de sincronización con cipionato de estradiol (CPE) como inductor de la ovulación.

Biondini *et al.*, (2011), reportaron el uso de sales de estradiol en programas de sincronización de estros. Evaluaron el efecto de dos tratamientos para sincronizar la ovulación; CPE vs BE, indicando tasas de preñez del 66,5% y 64,3% respetivamente, concluyeron que el uso de CPE en lugar del BE permite obtener similares tasas de preñez ($p > 0,05$).

El CPE ha sido utilizado para reemplazar al BE administrado vía IM 24 h después de retirado el dispositivo intravaginal con progesterona, sin afectar los porcentajes de preñez. Uslenghi *et al.*, (2010), plantearon como objetivo de su trabajo evaluar el efecto de dos dosis de CPE inyectado al retirar un dispositivo de P4, sobre el

porcentaje de preñez, utilizando 79 novillas de 15 meses de edad. Se administró el día 0 del protocolo de sincronización de estro, un dispositivo de P4 más BE. El día 7 se retiró el dispositivo y se administró D(+) cloprostenol y en forma aleatoria se inyectó 0,5 mg de CPE, 1 mg de CPE o BE 24 h después. El diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonografía en dos oportunidades para evaluar preñez de IATF, así como para verificar mortalidad embrionaria. Se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la preñez. No se observaron efectos del tratamiento ($p > 0,05$) sobre los porcentajes de preñez (51,9%) y se observó un 7,3% de pérdidas embrionarias ($p > 0,05$). Finalmente concluyeron que la administración de 0,5 o 1 mg de CPE en lugar de BE a las 24 h posteriores. La aplicación de estrógenos a las 24 h post retiro de los dispositivos genera la manifestación de celo por parte de los animales e induce el pico preovulatorio de LH necesario para la ovulación del folículo dominante generado de la onda de crecimiento folicular (Uslenghi et al, 2010). Esto permite sincronizar las ovulaciones de los animales cíclicos e inducir actividad sexual en animales en anestro. La implementación de los protocolos de control del ciclo estral requiere un gran número de encierres de animales, que en algunos casos es causa de estrés severo si no se toman ciertos recaudos, con la consecuente disminución de la fertilidad y fracaso de la técnica. En tal sentido resulta de interés estudiar otros protocolos que disminuyan la cantidad de encierres necesarios, por lo cual se recurrió a la utilización del cipionato de estradiol (CPE) inyectado en el momento de retirar el dispositivo en reemplazo del benzoato de estradiol que se administra 24 h posteriores (Callejas et al 2005).

El CPE, es un éster de estradiol (sal de estradiol) que posee una vida media más larga por la baja solubilidad en agua, lleva a un atraso y una alta dispersión del día de la emergencia de la nueva onda de crecimiento folicular (Bó, 2005). Y se ha utilizado no solo en la sincronización de estros para inseminación artificial, sino que también para los programas de sincronización de receptoras para transferencia de embriones.

Para los protocolos TETF se realizaron algunas modificaciones teniendo en cuenta los resultados con protocolos hormonales para inseminación artificial y así disminuir el protocolo de sincronización de cuatro días a dos días de tratamiento, reduciendo en 50% el manejo en el corral y los encierros. Por lo tanto, la eCG y la aplicación de la ECP, favorecerán la formación de un cuerpo lúteo con mayor diámetro y más capacidad para producir progesterona. Linneo y Ortiz (2007) reportaron el efecto de diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG, Novormon 5000, Syntex, Argentina) en la tasa de utilización, tasa de concepción y tasa de preñez final en receptoras de embriones, utilizando un protocolo de sincronización de celos que reduce uno a dos días de trabajo en las receptoras respecto al protocolo tradicional. Para este experimento se utilizaron 243 novillas mestizas (*Bos indicus x Bos taurus*) con un promedio de 330 Kg. de peso vivo y condición corporal de 2.5 y 3.5 (Escala 1-5). En el día 0, todas las hembras recibieron un dispositivo intravaginal de segundo uso DIB (1g de P4, Syntex,) junto con 1mg de benzoato de estradiol (EB, Syntex) vía intramuscular (im.). En el día 8 todas los animales recibieron 150µg. D(+) Cloprostenol (Ciclase, Syntex,) im., más 0,5 mg de cipionato de estradiol (ECP) y se retiró el dispositivo a todos los animales y fueron divididas al azar para recibir: 200 UI de eCG (Grupo1); 300 UI (Grupo2) y 400 UI de eCG(Grupo3). Se consideró el día 10 como día del celo. En el día 17, previo a la transferencia de embriones se realizó palpación rectal con el objetivo de determinar la presencia de cuerpo lúteo (tasa de aprovechamiento) en los tres grupos. Los embriones fueron colectados de donadoras de las razas Nelore y Brahman. La transferencia se realizó mediante la técnica intravaginal en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo. Se realizó el diagnostico de preñez a los 45 días después de la transferencia mediante palpación rectal. Los resultados obtenidos fueron: La tasa de aprovechamiento para el Grupo 1 con 200 UI de eCG fue 81.3% (65/80), Grupo 2 con 300 UI de eCG 80% (63/79) y Grupo 3, 85.7% (72/84) con 400 UI de eCG de tasa de aprovechamiento. La tasa de concepción

para el Grupo 1 fue de 52.3% (34/65) con 200 UI de eCG, Grupo 2, 50.8% con 300 UI de eCG y 55.5% (40/72) con 400 UI de eCG en el Grupo 3. En la tasa de preñez se obtuvo 42,5% (34/80) con 200 UI de eCG en el Grupo 1, Grupo 2 con 300 UI de eCG 40.5% y 47.6% con 400 UI de eCG en la tasa de preñez en el Grupo 3. No hubo diferencia estadística significativa ($P>0,05\%$) en la tasa de aprovechamiento, tasa de concepción y tasa de preñez final. Y concluyeron que las tres dosis de eCG utilizadas son igualmente efectivas, así como las tasas de aprovechamiento, concepción y preñez y que el protocolo simplificado de sincronización de celos en hembras receptoras de embriones es adecuado permitiendo reducir uno a dos días de trabajo.

2.6. Pasos de la producción *in vitro*

2.6.1. Ovum Pick – up (opu).

Mejor conocida por sus siglas en inglés, OPU (Ovum Pick-up), la aspiración folicular transvaginal es una técnica mediante la cual los ovocitos inmaduros son recolectados de los folículos en los ovarios de una vaca viva por aspiración guiada mediante ultrasonografía a través de la pared vaginal. Esta técnica fue aplicada por primera vez en bovinos en 1988 al adaptar para tal fin los procedimientos de búsqueda ultrasonográfica transvaginal utilizados en humanos y aparece como una solución luego de intentos previos de aspiración de folículos en vacas vivas mediante técnicas como la laparotomía y la laparoscopia (Hernández, 2001). Para llevar a cabo esta técnica de aspiración folicular in vivo se requiere contar con un equipo de ultrasonografía, un transductor sectorial, una bomba de aspiración y un sistema de guía de la aguja. La sonda ultrasonográfica para OPU ha sido construida con la finalidad de que permita la manipulación de la aguja desde el exterior del animal y que el transductor esté en contacto con los ovarios; de ese modo, el extremo de la aguja pueda ser visualizado cuando penetra dentro de los folículos que serán aspirados. La aguja está conectada a la bomba de vacío por medio de una tubería plástica o de silicona, lo que permite que el contenido

folicular sea vaciado directamente al filtro, que es similar al utilizado para la recolección de embriones.

En primer lugar, al iniciar el trabajo, las hembras a utilizar deben ser sedadas con xilazina y además deben recibir anestesia epidural con lidocaina al 2% (3-5 ml/vaca), luego de esto se debe proceder a limpiar y desinfectar la vulva y el perineo.

Una vez realizada la higiene, se procede a introducir el transductor que tiene acoplado el sistema de guía de la aguja. No es necesario introducir la mano por la vagina para tal fin. La cabeza del transductor debe ubicarse en cualquiera de los lados del cervix, según sea el ovario a puncionar. Luego se introduce la mano izquierda por el recto y se fija el ovario contra la cabeza del transductor, lo que permite visualizarlo en la pantalla del equipo del ultrasonografía, al igual que a los folículos y la aguja. A su vez en la pantalla del ultrasonógrafo podemos apreciar la trayectoria de la aguja lo que nos permite ubicar los folículos para lograr una aspiración exitosa. Una vez ubicado el folículo a aspirar, se impulsa la aguja suavemente para que penetre la pared vaginal y luego la folicular; una vez logrado esto la bomba de vacío aspira el contenido y lo deposita en el filtro de embriones o en el recipiente destinado para tal fin. En cualquiera de los casos estos debe contener medio de aspiración heparinizado (PBS + 10% de suero fetal bovino). Posterior a esto los ovocitos son procesados igual que para fertilización *in vitro* (Hernández, 2001).

2.6.2. Uso de la OPU.

La OPU permite incrementar de forma significativa, el número de embriones transferibles y de preñeces por vaca al año, dada la posibilidad de reutilizar las vacas donantes de ovocitos a intervalos mucho más cortos en comparación con la técnica de superovulación y en comparación con la utilización de ovarios de matadero. La técnica permite realizar hasta dos sesiones de aspiración por

donante a la semana, obteniéndose en promedio unos 4,1 ovocitos/vaca/sesión. Además, este número puede llegar a 10,4 ovocitos/vaca/sesión, si las donantes son tratadas previamente con hormona folículo estimulante (FSH) y somatotropina (bST), por lo que se pueden llegar a obtener entre 50 (sin estimulación hormonal) y 100 (con estimulación hormonal, FSH+bST) becerros por vaca donante al año. Esto representa entre 3 a 4 veces el valor logrado con la transferencia de embriones clásica. Los resultados pueden estar afectados por factores como el diámetro de la aguja de aspiración, la presión de aspiración, el momento del ciclo estral en que se realice la aspiración, edad, raza y condición corporal de la donante, así como el uso de estimulación hormonal.

Además, la OPU permite incorporar hembras donantes que se rechazarían en los procedimientos de superovulación por razones de dificultades anatómicas en el cérvix como a una falta de respuesta o a una disminución progresiva de la respuesta al tratamiento superovulatorio. También pudiera ser que se trate de hembras que sean infértiles y que continúen vacías luego de cuatro o más servicios. No debe pasarse por alto la posibilidad de incorporar como donantes de ovocitos a hembras jóvenes e inclusive pre-púberes, lo que nos permitiría no solo acortar el intervalo generacional sino también acelerar las pruebas de progenie para la evaluación genética de sementales. Por supuesto que para esto es necesario aún mucha investigación.

Es importante resaltar que el uso de esta técnica no está restringido a bovinos y ha sido aplicada en diversas especies como son equinos, rumiantes silvestres y búfalos, además de representar una herramienta importante en la recuperación de especies en peligro de extinción. Otro uso potencial de la OPU es la posibilidad de aplicar tratamientos hormonales directamente en el ovario. Tal es el caso de la inyección intraovárica del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), que permite

incrementar la capacidad de desarrollo de ovocitos aspirados de ovarios de hembras pre-púberes.

En conclusión, la aspiración folicular transvaginal es un procedimiento que permite la recuperación repetida de ovocitos de donantes vivas, siendo una técnica de alta eficiencia y repetibilidad, lo que permite al combinarla con la fertilización *in vitro* superar con creces el número de becerros obtenidos por donante en un periodo fijo de tiempo en comparación con la superovulación. La aplicación de esta técnica puede, además, incrementar el número de donantes de ovocitos entre las cuales se podrá contar con hembras pre-puberales, lo que permitiría reducir el intervalo generacional y así incrementar el progreso genético (Hernández, 2001).

2.6.3. Fecundación *in vitro*.

Una vez se disponen los ovocitos maduros, el objetivo es lograr la fecundación de los mismos, para ello se incuban junto con espermatozoides capacitados en un medio Tyrode, suplementado con fuentes energéticas (piruvato, lactato) y albúmina sérica (Yanagimachi, 1994). En la especie bovina, la capacitación espermática se ve favorecida por la incorporación de heparina al medio. No obstante, para lograr unos resultados óptimos es necesario ajustar la concentración de heparina y el número de espermatozoides para cada eyaculado concreto (Lu y Seidel, 2004). Estas sustancias logran estimular el proceso de capacitación del espermatozoide que lo prepara para interaccionar y fecundar el óvulo.

La producción *in vitro* de embriones bovinos (PIVE), ha demostrado ser una tecnología reproductiva con una positiva relación costo-beneficio; por ejemplo, para la industria lechera de Nueva Zelanda la PIVE y el sexado de embriones representa en términos económicos un ingreso adicional por año de más de ochocientos mil dólares. En otros países como Holanda (Holland Genetics), Inglaterra (Genus), Italia (CIZ), Francia (UNCEIA), Canadá (DELTA) y Estados

Unidos (EMTRAM), por citar algunos, se viene aplicando esta tecnología en forma comercial por las compañías referidas en paréntesis. Básicamente, la PIVE comprende tres pasos: 1) la maduración *in vitro* de los ovocitos (MIV) obtenidos de ovarios por medio de aspiración folicular, 2) la fertilización *in vitro* (FIV) de los ovocitos madurados y 3) el cultivo *in vitro* (CIV) de embriones. En el mejor de los casos, aproximadamente el 40% de los ovocitos sometidos a la MIV alcanzan el estado de blastocisto, lo cual se ha convertido en el cuello de botella más importante de esta biotecnología. Sin embargo, al modificar algunos procedimientos dentro de la PIVE como la tensión de oxígeno durante la incubación ;, la duración en la maduración, el tiempo de coincubación de los gametos, la concentración espermática y el método para seleccionar los espermatozoides, se pueden mejorar las tasas de desarrollo embrionario (Urrego, et al. 2008)

2.7. Técnica de transferencia no quirúrgica transcervical.

Una vez realizado el examen rectal de la receptora y constatada la presencia de un cuerpo lúteo (CL) se inyecta una anestesia epidural baja (solución de xilocaína al 2%). La región perineal y vulva se lavan con jabón desinfectante y agua y, se secan (Rowe *et al.*, 1980).

El embrión es entonces colocado dentro de una pajuela esterilizada (0.25–0.5 ml) a la que se le ha cortado un extremo (aproximadamente 1,5 cm.), esto se realiza para que no se doble al ser introducida en el cérvix con la consiguiente pérdida del embrión. La colocación del embrión dentro de la pajuela se realiza de tal forma que el medio que posee el embrión queda entre 2 gotas de medio; separadas por aire.

Posteriormente la pajuela con el embrión se coloca dentro de la pistola de Cassou y ésta dentro de la funda plástica que, previamente ha sido esterilizada.

Con la mano izquierda el operador sujeta el cérvix a través de la pared del recto. La pistola se introduce en el canal cervical y su extremo se ubica, con ayuda de la mano izquierda, en el cuerno ipsilateral al CL. Una vez en la posición deseada (un poco más allá del cuerpo del útero) el embrión es depositado suavemente y la pistola se retira lentamente. Todo este procedimiento debe realizarse lo más rápido y delicadamente posible. El exceso de manipulación producirá daño a la mucosa del útero, que se traducirá en una baja en los resultados (Rowe *et al.*, 1980; Trowson *et al.*, 1978).

Aparte de la destreza y experiencia que son necesarias, con cualquiera de las técnicas descritas, es necesario que las receptoras sean animales sanos, que sus ciclos reproductivos hayan sido normales y que estén en buen estado de nutrición. En la medida que las receptoras estén en buenas condiciones, tanto sanitarias como nutricionales y reproductivas, y la técnica sea bien realizada, la eficiencia de la transferencia de embriones, traducida en preñeces, será mayor.

3. JUSTIFICACIÓN.

La Transferencia de Embriones (TE) ha tomado fuerza en los diferentes sectores ganaderos, sin embargo existen aspectos básicos que se deben tener presentes para generar resultados favorables para las ganaderías, por ello, el propósito de este trabajo para aportar con datos científicos que beneficien al sector pecuario sobre dicha técnica, es que nace la inquietud de realizar el presente trabajo de investigación en el cual se evaluó el efecto del tamaño del cuerpo lúteo sobre la tasa de preñez en vacas de la raza Brahman receptoras transferidas a tiempo fijo con embriones producidos *in vitro* para así determinar si el tamaño de este afecta los porcentajes en la tasa de preñez de un hato, y así determinar que vacas tendrán una mejor rentabilidad para ser transferidas, es decir cuales nos beneficiaran económicamente hablando.

La eficiencia tras la aplicación de la técnica de transferencia de embriones se pueden ver afectada por múltiples factores; por este motivo, es de fundamental importancia realizar un excelente proceso en la selección de las hembras donantes y por segundo lugar pero de igual importancia las elección de los animales receptores que van a ser incluidos en estos programas.

Al analizar los porcentajes de preñez reportados tras la aplicación de la técnica de TE, se encuentra entre el 50% o menos, uno de los aspectos que se deben considerar es que la gran mayoría de trabajos de TE, no realizan eficiente selección de las hembras receptoras, sin darle la importancia que son ellas, las que permiten el desarrollo del embrión hasta una gestación a término.

La ineficiencia reproductiva, en esta biotecnología puede ser de origen de las mismas hembras receptoras, relacionado puntualmente con algunos aspectos de condiciones de las estructuras ováricas de la hembra, lo que puede incidir

directamente en las concentraciones de progesterona plasmática. Por tal motivo debe evaluar el ciclo estral de este tipo de hembras, debido a que un pobre desarrollo folicular con un subsecuente bajo desarrollo luteal, lo que genera unas concentraciones plasmáticas de progesterona insuficientes, para ofrecer un medio ambiente uterino adecuado al momento de transferir el embrión; ello, desencadena pérdidas embrionarias, ya que se ven afectados los mecanismos de establecimiento y mantenimiento de la gestación.

Teniendo en cuenta lo anterior se hace fundamental realizar selecciones detalladas y objetivas de las hembras que se seleccionaran y utilizaran para receptoras, en los programas de TE, utilizando como factor de calidad el diámetro del cuerpo lúteo, con el fin de favorecer las tasas de preñez y con ello disminuir el costo de producir una cría viva, ya sean en programas a campo o en una central de biotecnología, la obtención, mantenimiento y selección de las receptoras condicionarán el éxito o el fracaso del mismo, existen trabajos relacionados con la raza y la tasa de preñez en receptoras bovinas.

4. HIPÓTESIS.

Las vacas de raza Brahman con cuerpo lúteo de mayor diámetro, tienen mayor tasa de preñez cuando son transferidas a tiempo fijo con embriones producidos *in vitro*.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo General.

Evaluar la influencia que tiene el tamaño del cuerpo lúteo en la tasa de preñez en vacas de la raza brahmán, sincronizadas a tiempo fijo para ser transferidas con embriones producidos *invitro*.

5.2. Objetivos Específicos.

- Determinar el porcentaje de preñez en vacas de la raza brahmán, sincronizadas a tiempo fijo para ser transferidas con embriones producidos *in vitro*.
- Analizar la ventajas que tiene el tamaño del cuerpo lúteo en la tasa de preñez en vacas de la raza brahmán, sincronizadas a tiempo fijo para ser transferidas con embriones producidos *in vitro*.

6. MATERIALES

6.1. Equipo utilizado para la sincronización de estros:

- Ultrasonido
- Transductor
- Gel de ultrasonido
- Estabilizador de energía para el ultrasonido
- Extensión
- Lápiz/ marcador
- Alcohol
- Jabón
- Guantes de palpación
- Guantes de látex
- Jeringas de 10,5,3,1 ml
- Agujas de 18"
- Formatos
- Aretes y aplicador de estos
- Dispositivos de progesterona 1 gramo y su aplicador
- Benzoato de estradiol
- Bolsa de basura
- Yodo
- Raspador (utilizado para limpiar la zona de la vulva de las vacas, para aplicar los implantes intravaginales).
- Overol y botas

6.2. Equipo de retiro de los dispositivos de progesterona (protocolo de sincronización de estros:

- Lápiz/ marcador
- Alcohol
- Jabón
- Guantes de palpación
- Guantes de látex
- Jeringas de 10,5,3,1 ml
- Agujas de 18"
- Formatos
- Cipionato de estradiol
- Gonadotropina corionica equina
- Cloprostenol sódico
- Bolsa de basura
- Yodo
- Overol y botas

6.3. Equipo para la aplicación de la aspiración guiada por ultrasonido (OPU)

- Ultrasonido/cable de ultrasonido
- Bomba de vacío
- Manguera de bomba
- Cable de la bomba
- Guía de aspiración
- Agujas de OPU
- Sistema de aspiración
- Jeringas de 5 ml sin rosca (para aplicar la lidocaína de bloque epidural)
- Aguas de 18"
- Anestesia local (lidocaína)
- Papel de campo

- Jeringa de 20 ml
- Solución salina (para limpiar la guía)
- Camisas sanitarias
- Gel de ultrasonido
- Gel de palpación
- Guantes de palpación
- Guantes de nitrilo
- Alcohol 70%
- Tijeras
- Cinta adhesiva
- Pluma/marcador
- Extensión eléctrica
- Estabilizador de energía para el ultrasonido
- Overol y botas
- Termo de nitrógeno (el equipo de OPU es el que tiene que enviar tanto los ovocitos como el semen que los dueños quieran para realizar la fertilización *in vitro*).

6.4. Equipo utilizado en búsqueda y selección de ovocitos:

- Alcohol 70%
- Papel toalla
- Regulador de energía
- Baño María
- Extensión eléctrica
- Gradillas para tubos de 50 ml
- Tubos de 50 ml
- Pinzas hemostáticas
- Jeringas de 20 ml y 1 ml /aguja de 18"
- Superficie de calentamiento con su adaptador

- Cargador de la transportadora
- Filtros de búsqueda de ovocitos
- Linterna
- Placas de 90 mm y 60 mm
- Puntas amarillas y blancas
- Pipetas de 20, 200
- Marcador, lápiz, borrador, sacapuntas, calculadora
- Papel parafilm
- Gorro, tapabocas, bata
- Formato de búsqueda del laboratorio
- Nevera de icopor del PBS con geles refrigerantes
- Medio de transporte de ovocitos
- Heparina sódica
- Estereoscopio
- Transportadora de ovocitos
- Termo de transporte de semen
- Cilindro de gas.

6.5. Material y Equipo para la transferencia de embriones (TE):

- Máquina de transporte de embriones (transporta los embriones en la temperatura adecuada 36 grados Celsius).
- Convertidor de energía (regula la energía para prevenir que el ultrasonido sufra algún desperfecto).
- Listado de embriones (características del embrión, padre y madre, es decir toro y vaca).
- Listado de receptoras.
- Fundas para TE (son las que protegen al aplicador).
- Aplicador de TE
- Camisas sanitarias para TE

- Guantes de palpación
- Guantes de látex
- Lidocaína
- Agujas
- Jeringas sin rosca
- Porta navaja
- Navajas (para cortar la pajilla donde viene el embrión)
- Alcohol al 70 %
- Corta cola (manera en que la empresa marca a los animales de cada finca, para saber cuáles están transferidas)
- Raspador (para limpiar la vulva)
- Gel lubricante
- Papel
- Toallitas de limpieza
- Pistola para colocar aretes
- Aretes
- Pluma y lápiz
- Saca puntas
- Borrador y tijeras
- Overol y botas

7. MÉTODO.

7.1 Animales del estudio:

En el presente estudio se utilizaron 216 hembras receptoras de la raza Brahman de 3 a 5 partos, las cuales fueron destetadas y sometidas a un mismo manejo nutricional, suplementadas con sales minerales de una sola marca comercial, y se mantuvieron en pastoreo a base de *Brachiaria brizantha*, agua a voluntad, la cual se obtuvo de un mismo río ubicado dentro de la hacienda.

Todas las hembras, destinadas para receptoras de embriones *in vitro*, fueron sometidas a chequeo ginecológico a través de un monitoreo mediante ultrasonografía, utilizando un ecógrafo tipo Aloka modelo SSD 500 con sonda lineal transrectal comprada de 5 MHz de frecuencia (Aloka SSD 500, 5 MHz linear transducer, Tokyo, Japan), para determinar su ciclicidad de las posibles receptoras de embriones, los animales que presentaron cuerpos lúteos o folículos se consideraron aptos para la investigación, los que no presentaron estructuras ováricas, no fueron tenidos en cuenta para el trabajo.

De igual forma se determinó los siguientes criterios de inclusión:

- Útero no muy grande (que no sea difícil para la manipulación a la palpación rectal).
- Útero limpio (sin contenido patológico), es decir, sin la presencia de líquido
- Que estuvieran ciclando, es decir, con presencia de estructuras ováricas, ya sea un cuerpo lúteo o un folículo dominante.
- El cérvix no debe estar tortuoso para facilitar la permeabilidad al útero por la pistola de transferencia.
- Condición corporal de 3.5 puntos de score corporal, en una escala de 1 a 5, donde 1 es un animal muy delgado y 5 un animal muy obeso.

7.2. Obtención de embriones *in vitro*.

La obtención de los embriones, se llevó a cabo mediante la técnica de aspiración folicular *in vivo* de las vacas donadoras, utilizando un equipo de ultrasonografía, un transductor sectorial, una bomba de aspiración y un sistema de guía de la aguja. La aguja estuvo conectada a la bomba de vacío por medio de una tubería plástica o de silicona, lo que permito que el contenido folicular y posteriormente llevado directamente a un filtro, que es similar al utilizado para la recolección de embriones.

Para ello, las hembras donantes de ovocitos, recibieron anestesia epidural baja con lidocaina al 2% (3-5 ml/vaca), luego de esto se procedió a limpiar y desinfectar la vulva y el perineo.

Una vez realizada la asepsia de la zona, se introdujo el transductor que tiene acoplado el sistema de guía de la aguja, vía vaginal. La cabeza del transductor fue ubicada en los lados fondo se sacó ciego del primer anillo del cervix, según sea fue el ovario a puncionar. Luego se fijó el ovario contra la cabeza del transductor, con la mano izquierda, la cual se encontraba vía rectal. Para la punción folicular se visualizó en la pantalla del equipo del ultrasonografía, el ovario, los folículos y la aguja, logrando con ello establecer la trayectoria de la aguja lo que nos permitiendo ubicar los folículos para realizar una aspiración exitosa.

Una vez era ubicado el folículo a aspirar, se impulsaba la aguja suavemente para que penetre la pared vaginal y luego la folicular; una vez logrado esto la bomba de vacío aspira el contenido y lo deposita en el filtro de embriones o en el recipiente destinado para tal fin, utilizando un medio de aspiración heparinizado (PBS + 10% de suero fetal bovino) según la metodología de Hernández, (2001). Posterior a esto los ovocitos fueron son procesados bajo estrictos estándares de laboratorio que para fertilización *in vitro*.

7.3. Fecundación in vitro (FIV):

Una vez, los ovocitos fueron maduros (TCM 199 suplementado hormonalmente y con fuentes energéticas) por 24 horas en incubadora a 38.5°C, 5% de CO₂ y 5% de Oxígeno, se procedió a generar los trabajos de FIV y lograr la fecundación de los mismos, para ello se incubaron junto a espermatozoides capacitados en un medio Tyrode, suplementado con fuentes energéticas (piruvato, lactato) y albúmina sérica según la metodología de Yanagimachi, (1994), donde se dejaron los gametos de las hembras y los machos durante 18 a 24 horas en incubadora a 38,5%.

Luego se efectuó el cultivo in vitro (CIV) de embriones, puesto que luego de pasadas 24 horas del FIV, los presuntos cigotos se transfirieron a un medio de cultivo mSOF IVC suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y luego de 56 horas de cultivo se evaluó la segmentación, división, y posteriormente se observó el desarrollo embrionario al séptimo. (Blastocisto, blastocisto Expandido), para luego ser transferidos a las hembras receptoras.

7.4 Protocolos de sincronización de estros para las receptoras de embriones y transferencia de embriones.

Todos los animales que salieron aptos para ser receptoras de embriones (216 hembras), fueron sometidas a un protocolo de sincronización de estros, a base de dispositivos intravaginales de progesterona 1 gramo y benzoato de estradiol 2,0 mg; el dispositivo de progesterona se dejó insertado por ocho días en los animales, luego de ello se realizó el retiro de este y se aplicó gonadotropina coriónica equina (300 UI), más 0,5 mg de cloprostenol sódico y 0.5 mg de cipionato de estradiol y en el día 16 de protocolo de sincronización se realizó la transferencia de embriones (cuadro 1).

Así mismo, el día 16 del protocolo se realizó una evaluación por medio de un ecógrafo tipo Aloka modelo SSD 500 con sonda lineal transrectal comprada de 5

MHZ de frecuencia (Aloka SSD 500, 5 MHz linear transducer, Tokyo, Japan) y con ello se clasificaron de los Cuerpos Lúteos (CL) por diámetro, al momento de la transferencia embrionaria, se consideró la metodología según Duran y Ortiz (2010), modificado por el autor, donde se clasificaron los CL de la siguiente forma; grado 4: 16mm, grado 3: 18mm, Grado 2: 20mm y Grado 1 22mm.

CUADRO 1. PROTOCOLO UTILIZADO PARA LAS VACAS RECEPTORAS DE EMBRIONES IN VITRO.

Día de Aplicación	Proceso desarrollado	Concentración	Dosis	Vía de administración	Casa comercial
0	Implante de progesterona	1g/implante	1 implante (1g)	intravaginal	Sincrogest (Ourofino)
0	Aplicación de benzoato de Estradiol	100mg/100ml	2mg – 2ml	intramuscular	Sincrobiol (Ourofino)
8	Retiro de implante				
8	Aplicación de gonadotropina coriónica equina	500 a 1000 UI	300UI-1.5ml	intramuscular	Folligon (MSD)
8	Cloprostenol Sódico	26.30mg/100ml	0.5mg – 2ml	intramuscular	Sincrocio (Ourofino)
8	Cipionato de Estradiol	100mg/100ml	0.5mg – 0.5 ml	intramuscular	Sincro CP (Ourofino)
9	OPU (Donantes)				
10	FIV (Donantes)				
16	Transferencia				

Nota: el transferidor siempre fue un mismo técnico, DVM, PhD LuizTonissiNasser.

Luego de los exámenes y registros ecográficos de los cuerpos lúteos, se procedió a realizar la transferencia de los embriones, para ello se inyectó anestesia epidural baja (solución de lidocaína al 2%). Y en la región perineal y vulva se realizó procedimientos de asepsia total de la zona, con jabón desinfectante, agua no contaminada y, procedió a secar la zona, según la metodología de Rowe et al (1980).

Los embriones fueron almacenados dentro de una pajuela esterilizada (0.25ml) a la que se les cortado un extremo (aproximadamente 1,5 cm.), esto se realizó, para

evitar con ello que se doblara al ser introducida en el cérvix y con ello se evitó la pérdida del embrión, La colocación del embrión dentro de la pajuela se realizó de tal forma que el medio que posee el embrión (me) queda entre 2 gotas de medio (m); separadas por aire (a).

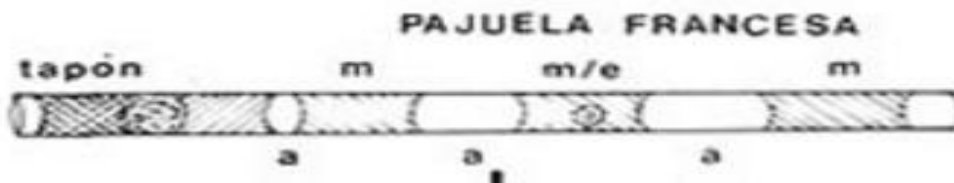


ILUSTRACIÓN 1 PAJUELA FRANCESA

Fuente: Colin y de Grenade (2004).

Posteriormente la pajuela con el embrión fue colocada dentro de la pistola de Cassou y ésta dentro de la funda plástica que, previamente había sido esterilizada. Luego de ello, con la mano izquierda, se sujetó el cérvix de la hembra receptora de embriones, a través de la pared del recto. La pistola se introdujo por el canal cervical y su extremo se ubicó con ayuda de la mano izquierda, realizando la transferencia de los embriones en el cuerno ipsilateral al CL. Una vez se ubicó la posición deseada (un poco más craneal del cuerpo del útero) el embrión fue depositado suavemente y la pistola se retiró lentamente.

7.4 Colecta de datos.

Los datos recolectados fueron debidamente consignados en planillas de anotación para luego ser tabulados y procesados, según los parámetros de medición necesarios en la investigación. Utilizando un muestreo sistemático, según el diseño completamente al azar que se utilizó, cuando las vacas llevaban al sistema de selección y luego que fueron evaluadas ginecológicamente con el ultrasonido descrito anteriormente; y que cumplían los requisitos de selección anteriormente descritos, se sometían a los procesos de sincronización de estros, se medían los diámetros de los CL en día 16 de protocolo, estos datos se obtenían y se

tabulaban, y luego de 35 días se procedió a la determinación de preñez por medio de ultrasonido, y los datos se obtenían, para luego determinar relación entre el diámetro de cuerpo lúteos, con la preñez en receptoras de embriones in vitro.

8. LÍMITE DE ESPACIO.

El estudio se desarrolló en el distrito de Tonosí, provincia de Los Santos – República de Panamá. Los Santos es una provincia panameña, situada al sur de la península de Azuero. Las Tablas su capital y localidad más poblada. Con una superficie de 3 809,4 km² y una población de 89 592 habitantes, se ubica 7°36'N 80°27'O con una temperatura promedio de 28°C y posee un clima tropical, con dos épocas marcada la seca y la lluviosa. La primera de ellas se extiende desde finales de noviembre hasta inicios de mayo, y la segunda, desde mayo hasta noviembre. En la práctica las divisiones entre ambas estaciones son cada vez más inciertas, caracterizándose la provincia por temperaturas que oscilan entre los 23°C y los 32°C en las costas, con mínimas de 14°C en la región montañosa. Las precipitaciones se sitúan en torno a 1200 mm anuales en la costa, aumentando los valores en las zonas montañosas hasta los 4.000 mm, lo que permite la presencia de bosques nublados.

Uno de los factores básicos en la definición del clima es la orografía, ya que el relieve no sólo afecta el régimen térmico produciendo disminución de la temperatura del aire con la elevación, sino que afecta la circulación atmosférica de la región y modifica el régimen pluviométrico general.

En Panamá se han definido dos períodos estacionales del clima, estación seca y estación lluviosa.

El régimen pluviométrico de la región Central del país donde realizamos nuestro estudio (provincia de los santos) es la siguiente las lluvias se producen por lo general después del mediodía, provocadas por los flujos predominantes procedentes del Caribe o del Pacífico. Son lluvias entre moderadas y fuertes,

acompañadas de actividad eléctrica y vientos fuertes. Esta región presenta la zona más continental del país, por lo que, los contrastes térmicos y orográficos juegan su papel.

La estación seca tiene generalmente su inicio a mediados de diciembre, pero con variaciones de hasta 3 o 4 semanas. Para esta época, los fuertes vientos provenientes del noreste conocidos como “vientos alisios” comienzan a soplar, con poca o ninguna precipitación lluviosa durante muchas semanas seguidas. Las temperaturas diurnas aumentan ligeramente hasta alcanzar unos 30-31°C (86-88°F), pero las temperaturas nocturnas se mantienen alrededor de 22-23°C (72-73°F). La humedad relativa disminuye durante toda la estación hasta alcanzar valores promedios de 70%.

La estación lluviosa empieza alrededor del 1 de mayo, pero también puede variar por una o dos semanas. Con la llegada de las lluvias, las temperaturas descienden ligeramente durante el día y los vientos alisios desaparecen. La humedad relativa aumenta rápidamente y puede mantenerse entre 90% y 100% durante toda la estación lluviosa.

La Hacienda la Barrera, donde se desarrolló puntualmente la investigación, es una finca, que se encuentra en la provincia de los Santos; cuyo propietario tiene una trayectoria de más de 30 años dedicado a la cría del ganado brahmán y decide ampliar su producción con la instalación de una lechería utilizando la raza brahmán como receptoras para ser transferidas con embriones de Girholando.

El sitio específico es un corral de manejo ubicado dentro de los terrenos de la Hacienda; el cual cuenta con un tronco de contención para asegurar a las vacas y así poder trabajar con seguridad tanto para el técnico como para el animal.

Influencia del tamaño del cuerpo lúteo, sobre la tasa de preñez, en vacas de la raza brahman, sincronizadas a tiempo fijo, para transferencias de embriones producidos *In vitro*

ILUSTRACIÓN 2 MAPA DE LOCALIZACIÓN DE LA HACIENDA LA BARRERA, DISTRITO DE TONOSÍ, PROV. LOS SANTOS, REP. DE PANAMÁ



FUENTE: Instituto Geográfico Nacional "Tomy Guardia"

9. LÍMITE DE TIEMPO.

El estudio se desarrolló en el trimestre comprendido de febrero – mayo del 2014, desarrollando la investigación, en el período de estación seca del país y en la región central, en donde las precipitaciones son menores aún en período lluvioso. El trabajo se dividió en 6 repeticiones para favorecer la logística de la investigación y así lograr obtener resultados fidedignos, donde se concentraron en eventos importantes como la sincronización, el OPU, la transferencia de embriones y el diagnóstico de preñez (cuadro 2)

CUADRO 2. REGISTRO DE PROTOCOLO APLICADO POR FECHA.

Evento/grupo	A	B	C	D	E	F
SINCRONIZACIÓN	03/02/14	07/02/14	10/03/14	15/03/14	31/03/14	12/04/14
RETIRO	11/02/14	15/02/14	18/03/14	24/03/14	08/04/14	21/04/14
OPU	12/02/14	16/02/14	19/03/14	25/03/14	09/04/14	22/04/14
TRANSFERENCIA	20/02/14	24/02/14	27/03/14	02/03/14	17/04/14	30/04/14
DIAGNOSTICO DE PREÑEZ	15/03/14	21/03/14	21/03/14	25/04/14	12/05/14	23/05/14

Es importante resaltar, que las fechas iniciales de los programas fueron establecidas de acuerdo a la disposición de trabajo con los que contaba la finca.

10. RESULTADOS.

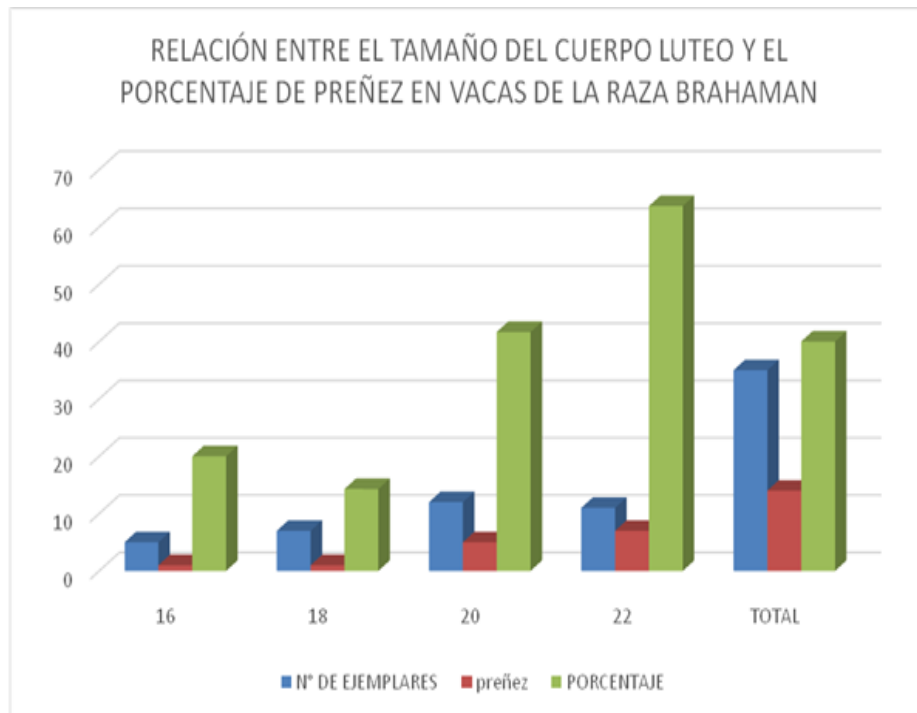
Los resultados del presente estudio se muestran en los siguientes cuadros y gráficas.

TABLA 2 Efecto del tamaño del cuerpo lúteo sobre la tasa de preñez en vacas Brahman transferidas con embriones producidos in vitro. Grupo A

Tamaño del CL mm	N° DE EJEMPLARES	N° ANIMALES PREÑADOS	PORCENTAJE %
16	5	1	20
18	7	1	14.3
20	12	5	41.7
22	11	7	63.6
TOTAL	35	14	40

Como se aprecia en la tabla 2, el porcentaje total de preñez en vacas Brahman transferidas con embriones producidos in vitro del grupo A, donde se muestrearon 35 animales y quedaron preñados 14, obteniendo el 40 % (14/35). De las cuales, las hembras con un diámetro de 22mm, generaron una tasa de preñez del 63,6% (7/11).

GRAFICA 1. GRUPO A. MUESTRA DE 35 EJEMPLARES.



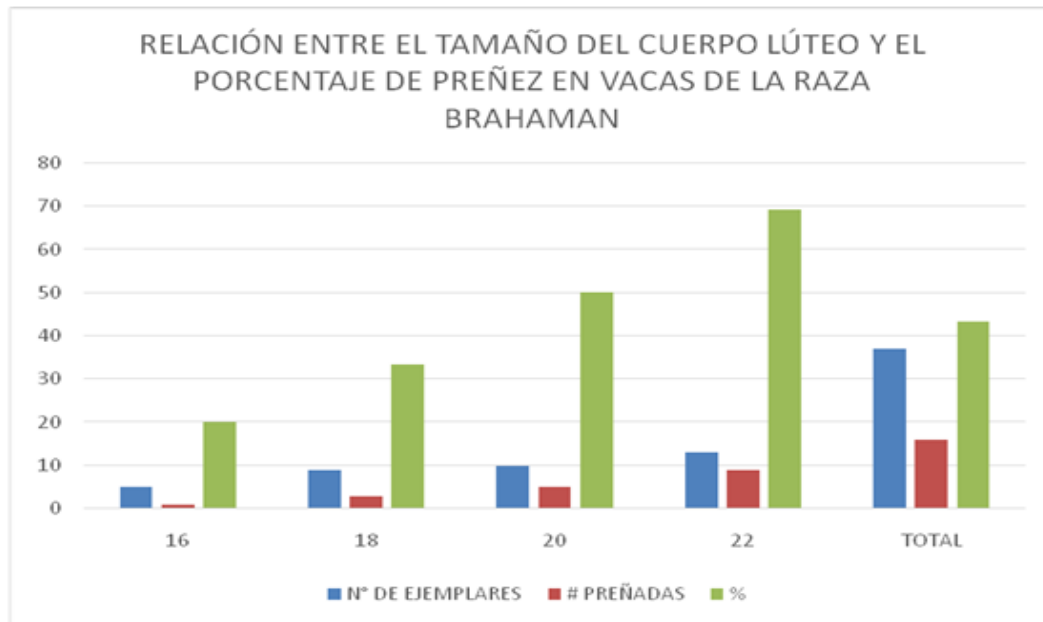
En esta gráfica se pueden observar de una manera más clara, como las probabilidades de preñez en vacas de raza Brahmán, con cuerpo lúteo de tamaño 22 aumentan; pues como expresamos anteriormente, de las 14 vacas que resultaron preñadas, 7 corresponden a las vacas con un cuerpo lúteo de 22, garantizándonos el 50% de éxito en la aplicación de este tratamiento.

TABLA 3 Efecto del tamaño del cuerpo lúteo sobre la tasa de preñez en vacas Brahman transferidas con embriones producidos in vitro. Grupo B

Tamaño del CL mm	N° DE EJEMPLARES	N ANIMALES PREÑADOS	PORCENTAJE DE PREÑEZ%
16	5	1	20
18	9	3	33.3
20	10	5	50
22	13	9	69.2
TOTAL	37	16	43.2

En la tabla 3, se observa los resultados del grupo B, donde se trabajaron 37 ejemplares, de las cuales 16 resultaron preñadas, las hembras con un cuerpo lúteo de 22mm, dando un porcentaje de 69,2% (9/13); luego las hembras con un cuerpo lúteo era de número 20mm, se obtuvo un 50% (10/5).

GRAFICA 2. GRUPO B. MUESTRA DE 37 EJEMPLARES.



En esta gráfica se observa que los resultados se mantienen constantes, en cuanto a los porcentajes de preñez en las vacas cuyo cuerpo lúteo es 22; es decir, se puede comprobar la hipótesis sobre las altas probabilidades de preñez en esos ejemplares.

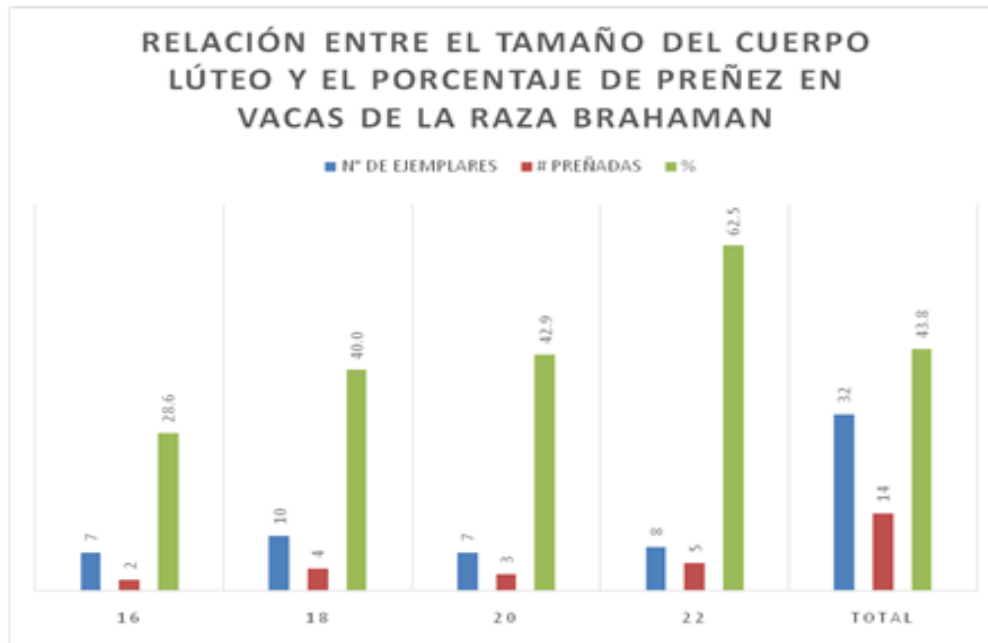
Entre mayor es el cuerpo lúteo de las vacas mayor porcentaje de preñez tiene la vaca.

TABLA 4 Efecto del tamaño del cuerpo lúteo sobre la tasa de preñez en vacas Brahman transferidas con embriones producidos in vitro. Grupo C

Tamaño del CL mm	N° DE EJEMPLARES	N ANIMALES PREÑADOS	PORCENTAJE DE PREÑEZ %
16	7	2	28.6
18	10	4	40.0
20	7	3	42.9
22	8	5	62.5
TOTAL	32	14	43.8

En la tabla 4, se observa los resultados del grupo C, donde En se muestrearon 32 vacas de las cuales 14 resultaron preñadas, cuyo mejor porcentaje lo obtuvieron las hembras con un diámetro del cuerpo lúteo era de 22mm; con un 62.5% (5/8).

GRAFICA 3. GRUPO C. MUESTRA DE 32 EJEMPLARES.



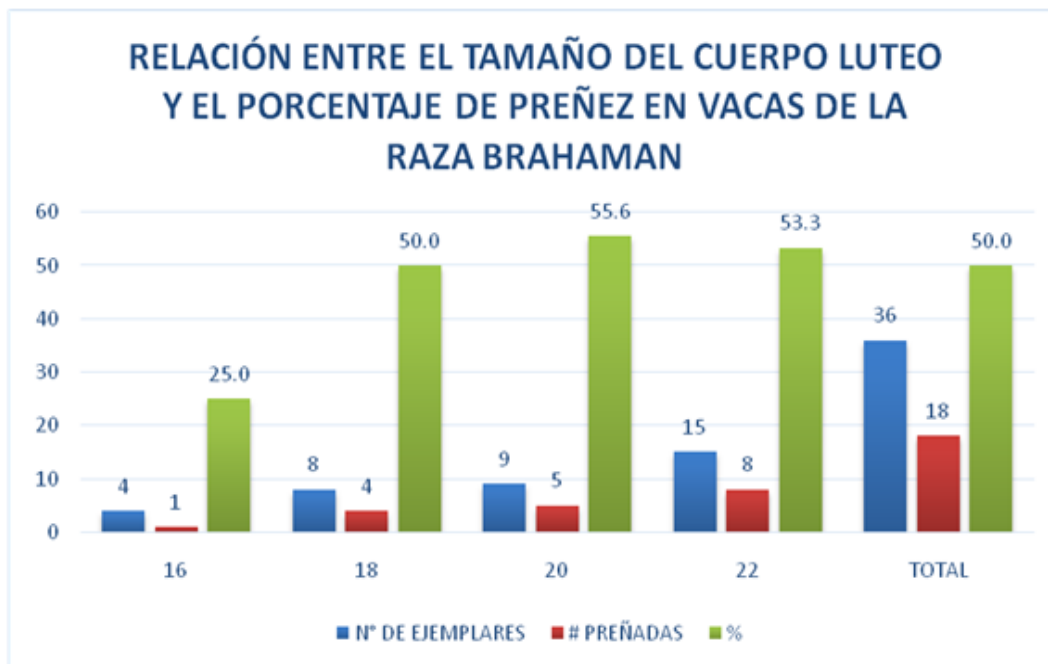
En esta gráfica, se puede constatar de una manera más clara las ventajas que presentan los ejemplares cuyo diámetro del cuerpo lúteo es de tamaño 22, pues el porcentaje de preñez es el más favorable, demostrando así la hipótesis descrita en el estudio.

TABLA 5 Efecto del tamaño del cuerpo lúteo sobre la tasa de preñez en vacas Brahman transferidas con embriones producidos in vitro. Grupo D

Tamaño del CL mm	N° DE EJEMPLARES	N ANIMALES PREÑADOS	PORCENTAJE DE PREÑEZ %
16	4	1	25.0
18	8	4	50.0
20	9	5	55.6
22	15	8	53.3
TOTAL	36	18	50.0

En la tabla 5, se observa los resultados del grupo D, donde se trabajó con un 36 ejemplares, de los cuales resultaron preñadas 18, es decir el 50%. Los mejores resultados se obtuvieron con las hembras que presentaban un cuerpo lúteo de tamaño 22mm, con un 53,3-% (8/15) resultaron preñadas; 9 poseían un diámetro en el cuerpo lúteo de 20mm con un porcentaje de preñez del 55,6% (5/9).

GRAFICA 4. GRUPO D. MUESTRA DE 36 EJEMPLARES



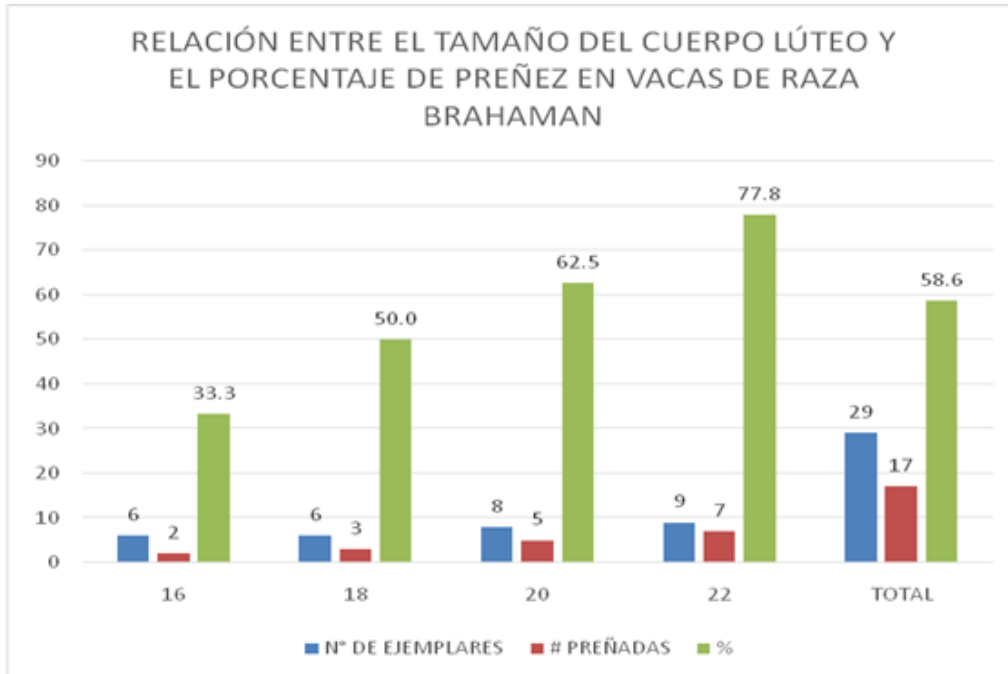
Como observamos en la gráfica el grupo de ejemplares con cuerpo lúteo de tamaño 22, sigue obteniendo los mejores resultados de preñez, aportando un 53.3% de las vacas preñadas, del total de grupo muestreado.

TABLA 6 Efecto del tamaño del cuerpo lúteo sobre la tasa de preñez en vacas Brahman transferidas con embriones producidos in vitro. Grupo E

Tamaño del CL mm	N° DE EJEMPLARES	N ANIMALES PREÑADOS	PORCENTAJE DE PREÑEZ%
16	6	2	33.3
18	6	3	50.0
20	8	5	62.5
22	9	7	77.8
TOTAL	29	17	58.6

En la tabla 7, se observa los resultados del grupo E, donde se muestrearon 29 ejemplares de vacas brahmán, obteniendo los siguientes resultados: las vacas con cuerpo lúteo número 22mm con una tasa del 77,8% (9/7). Mientras que las vacas con cuerpo lúteo de tamaño 20mm, obtuvieron un 62,5% (5/8).

GRAFICA 5. GRUPO E. MUESTRA DE 29 EJEMPLARES



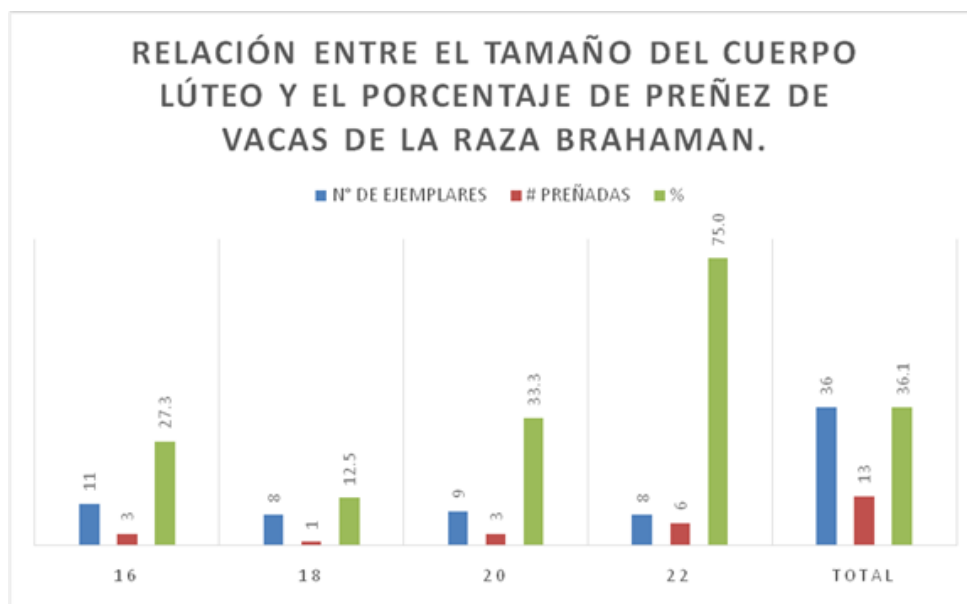
En esta gráfica se aprecia de manera evidente el alto porcentaje obtenido en las vacas cuyo cuerpo lúteo es de 22, con el 77.8; seguidos de las vacas con 20 de diámetro en su cuerpo lúteo y así sucesivamente, hasta llegar a 16. Esto permite comprobar, que se obtuvo mejores resultados de preñez, cuando el cuerpo lúteo es mayor diámetro.

TABLA 7 Efecto del tamaño del cuerpo lúteo sobre la tasa de preñez en vacas Brahman transferidas con embriones producidos in vitro. Grupo F

Tamaño del CL mm	N° DE EJEMPLARES	N ANIMALES PREÑADOS	PORCENTEJE DE PREÑEZ %
16	11	3	27.3
18	8	1	12.5
20	9	3	33.3
22	8	6	75.0
TOTAL	36	13	36.1

En la tabla 8, se observa los resultados del grupo 8, donde se trabajaron 36 ejemplares de los cuales 13 resultaron preñadas, dando un porcentaje total de 36.1; aunque a nivel total, este grupo obtuvo menos vacas preñadas; el aporte de las vacas cuyo cuerpo lúteo con un diámetro 22mm fue de 75% al porcentaje total (6/8).

GRAFICA 6. GRUPO F. MUESTRA DE 36 EJEMPLARES.



La grafica muestra de forma comparativa los diversos grupos de vacas con sus respectivos diámetros de cuerpo lúteo y se observa que las vacas con cuerpo lúteo de tamaño 22 es el mejor porcentaje de ejemplares preñadas.

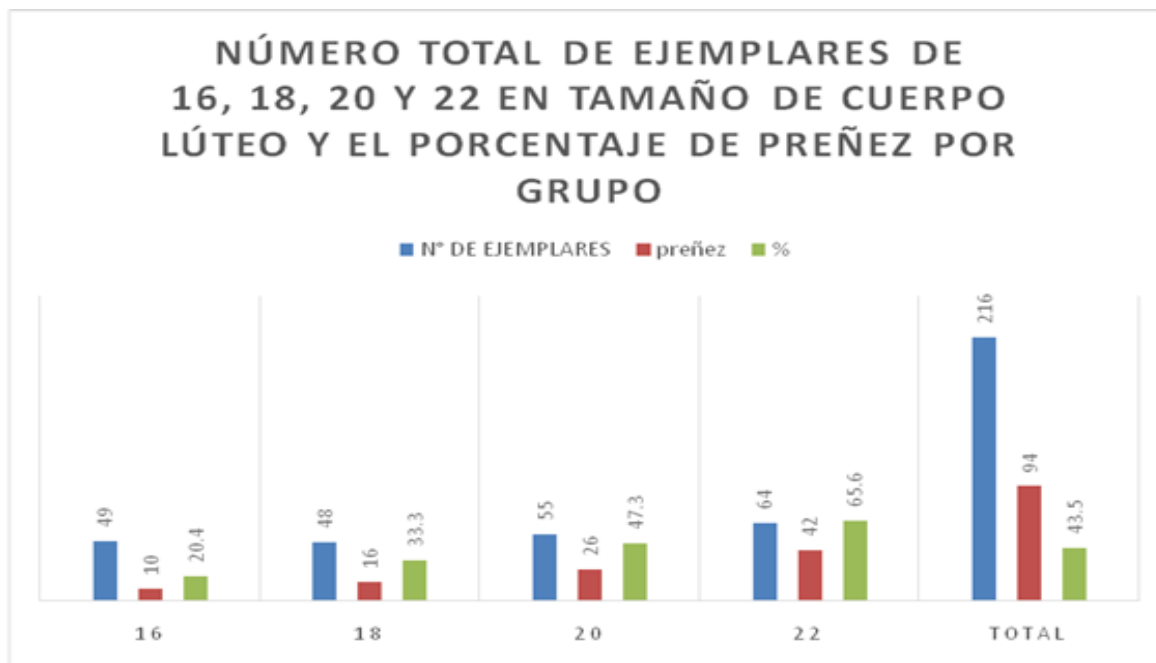
TABLA 8 Efecto del tamaño del cuerpo lúteo sobre la tasa de preñez en vacas Brahman transferidas con embriones producidos in vitro. Total de hembras analizadas

Tamaño del CL mm	Nº DE EJEMPLARES	N ANIMALES PREÑADOS	PORCENTAJE DE PREÑEZ %
16	49	10	20.4
18	48	16	33.3
20	55	26	47.3
22	64	42	<u>65.6*</u>
total	216	94	43.5

En la tabla 9, se observa el total de hembras trabajadas en toda la investigación, así como los diámetros analizados (16, 18, 20 y 22mm), y el registro de las tasas de preñez total.

Los porcentajes de preñez resultaron satisfactorios para el estudio, pues a través de ellos se pudo comprobar la hipótesis y alcanzar los objetivos. Las vacas cuyo diámetro estaba entre 22 y 20mm presentaron los mejores resultados de preñez, 65,6% y 47,4% respectivamente; esto garantizará al productor pecuario que se dedique a esta actividad, ejercer un control en las vacas que tenga en su hato y mejorar su producción.

GRAFICA 7. GRUPOS TOTALES.



La gráfica muestra el resumen final del total de ejemplares sometidos al estudio y de una forma comparativa, se observa que los mejores porcentajes son en los grupos de vacas con mayor diámetro en su cuerpo lúteo.

Para probar la hipótesis de que “ Las vacas de raza Brahman con cuerpo lúteo de mayor diámetro, tienen mayor tasa de preñez cuando son transferidas a tiempo fijo con embriones producidos *in vitro* “, se utilizó una prueba sobre diferencia de proporciones para muestras grandes utilizando la distribución t-student. A continuación se presenta la tabla de contingencia que resume la información obtenida en el estudio:

TABLA 9 TABLA DE CONTINGENCIA

	PREÑEZ		TOTAL
	SI	NO	
Cuerpo Lúteo 16 mm	10	39	49
Cuerpo Lúteo 18 mm	16	32	48
Cuerpo Lúteo 20 mm	26	29	55
Cuerpo Lúteo 22 mm	42	22	64
TOTAL	94	122	216

Los resultados de las pruebas estadísticas realizadas se resumen en la siguiente tabla:

TABLA 10 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS

HIPÓTESIS CONTRASTADAS	T-TABULAR	T-CALCULADO	P VALUE	DECISIÓN
Ho: P2 = P1 Ha: P2 > P1	1.645	1.45	P > 0.05	No
Ho: P3 = P2 Ha: P3 > P2	1.645	1.46	P > 0.05	No
Ho: P4 = P3 Ha: P4 > P3	1.645	2.04	P < 0.05	Si
Ho: P3 = P1 Ha: P3 > P1	1.645	3.04	P < 0.05	Si
Ho: P4 = P1 Ha: P4 > P1	1.645	5.46	P < 0.05	Si
Ho: P4 = P2 Ha: P4 > P2	1.645	3.58	P < 0.05	Si

Como se observará, no se encontró suficiente evidencia estadística para afirmar que las vacas de raza Brahman con cuerpo lúteo de 18 mm tienen una mayor tasa de preñez que aquellas con cuerpo lúteo de 16 mm. Tampoco se encontró suficiente evidencia estadística para afirmar que las vacas con cuerpo lúteo de 20 mm tienen mayor tasa de preñez que aquellas de 18 mm.

Sin embargo se pudo probar que las vacas con cuerpo lúteo de 20 mm y de 22 mm tienen una tasa de preñez mayor que aquellas de 16 mm. . También se pudo probar que las vacas con cuerpo lúteo de 22 mm tienen mayor tasa de preñez que las de 18 mm. Un hallazgo muy importante de esta investigación es que las vacas con cuerpo lúteo de 22 mm tienden a tener una mayor tasa de preñez que aquellas con 20 mm. Sin duda un cuerpo lúteo de 22 mm conduce a obtener mayor tasa de preñez en estos animales.

11. DISCUSIÓN

11.1. Porcentaje de preñez de las hembras receptoras del estudio.

En la presente investigación la tasa de preñez luego de la TE fue del 43,5%, estos datos pueden ser comparados con los reportados por Nogueira *et al* (2012), donde indicaron un porcentaje de preñez del 44,1% (67/152), Siqueira *et al* 2009, reportaron porcentajes del 58.8% preñez. Gonella-Diaza *et al* (2013) indicaron tasas de preñez del 31,4%, así como las obtenidos por Benyei *et al.* (2006; 34,2%) y Aller *et al.* (2000; 31,5%) Como se pudo observar los resultados son similares a los que indica la literatura, esto se puede deber a la calidad de los embriones utilizados para la transferencia en la presente investigación, los cuales fueron de excelente calidad, lo que pudo favorecer las tasas de preñez.

11.2. Clasificación de diámetro de estructuras ováricas (CL) de las hembras del estudio.

Las tasas de preñez en el actual trabajo (65,6% para cuerpos lúteos de 22mm) son superiores a las de otros autores. Ortiz (2000), donde obtuvo tasas de preñez del 27,7% para CL grado 1, Baruselli *et al.*, (2001), un 58,4%, para CL grado 1, Gonella-Diaza *et al* (2013) indicaron que CL grado 1 de 24 mm (39.7%) y Duran y Ortiz (2010), donde indicaron que cuerpos lúteos Grado 1 (52,4%), mientras que si se reducía el diámetro del CL, se disminuía la tasa de preñez (15,9%), dicho comportamiento estuvo presente en la actual investigación.

La tasa de preñez a los 35 días post-transferencia en la actual investigación para las hembras con CL de 22 mm (65.6%); en relación a la tasa de preñez con CL de 20 mm fue de 47.3%; en relación al CL de 18 mm, la tasa obtenida fue de 33.3% y finalmente los CL de 16 mm, obtuvieron tasas de preñez del 20,4%, estos porcentajes, se pueden explicar si se tiene en cuenta factores que pueden afectar positiva o negativamente, como es el caso del clima; , pues bien, en el trópico

debido a la ausencia de estaciones marcadas se han realizado estudios dependiendo de si se está en época seca o en época de lluvias.

Díaz y García (1999) evaluaron el efecto de la pluviosidad sobre los porcentajes de preñez en programas de transferencia de embriones en razas cebuínas en el trópico bajo colombiano, encontrando que no había relación entre la pluviosidad mensual y la tasa de preñez, cosa similar se puede definir en la presente investigación puesto que la temporada de transferencias embrionarias se dio en los meses de febrero a marzo, con un promedio de temperatura de 28°C, esto si se lleva a extrapolación de las temperaturas confort de un ganado cebú (Brahmán), donde su temperatura de confort máxima es de 35°C, se puede indicar que las receptoras de este trabajo por más que fueron trabajadas en una temporada seca, como se manifestó anteriormente no llegaron a sufrir estrés térmico y su termorregulación se dio adecuadamente, lo que no afectó los niveles de nutrición de estas receptoras, lo que pudo conllevar que presentaran reservas de colesterol adecuadas para regenerar una esteroidogénesis y con ello presentar mejorar cuerpos lúteos que favorecieron a las tasas de preñez.

Otro aspecto son los fenómenos fisiológicos asociados a las estructuras ováricas representan un punto de control, para los adecuados resultados en técnicas de transferencias embrionarias (Duica *et al* 2007), de igual forma la relación positiva que posee el tamaño del CL sobre la tasa de preñez es primordial para mejorar los resultados de la TE. (Gonella-Diaza *et al* 2013)

Por tal motivo la importancia hacer un seguimiento de las estructuras ováricas presentes durante la sincronización así, como de las etapas previa y posterior a TE. De este modo, un óptimo desarrollo folicular será determinante para la formación de un cuerpo lúteo que genere concentraciones plasmáticas de progesterona suficientes para ofrecer un medio ambiente uterino adecuado y

favorecer el óptimo desarrollo embrionario (Duica *et al* 2007). Por tal motivo verificar la presencia de estructuras que demuestran ciclicidad ovárica, son fundamentales para los programas.

Vasconcelos *et al.*, (2001), indicaron que receptoras que presentaban cuerpos lúteos de más de dos centímetros de diámetro tasa de concepción del 58% en hembras a las que se le transfirió un embrión el día siete después del estro. 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%.

Es así como indica Duica *et al* (2007), que el conocimiento de las estructuras ováricas, sus características e interrelaciones en la hembra receptora de embriones, en cuanto al desarrollo folicular y la estructuración y funcionalidad del cuerpo lúteo, es fundamental para lograr ofrecer un adecuado medio ambiente uterino al embrión y así contribuir así a mejorar la eficiencia en los programas de transferencia de embriones.

Otro factor que puede afectar las tasas de preñez, es la raza de los receptoras de embriones, es así como se indica que para favorecer la fertilidad de las hembras que recibirán los embriones, estas deberán ser F1 (Bos Taurus x Bos indicus), que animales puros, sin embargo estudios realizados por Cutini *et al* (2000), indicaron que no existen diferencias entre las tasas de preñez entre las razas Taurus (46,0%), Indicus (43,2%) y doble propósito (43,9%), esto indica que si el manejo es adecuado a las receptoras favorecerá a las tasas de preñez. Este factor se presentó en la actual investigación, puesto que el manejo del protocolo de sincronización de estros a base de progesterona, estrógenos y demás hormonas

relacionadas anteriormente, fue fundamental para que la presentación de estros no fuera un factor negativo para las tasas de preñez, aspecto importante cuando se manejan receptoras de embriones de razas cebuinas como en la actual investigación, no obstante las tasas de preñez se midieron por la presencia de preñez por medio de ecografía a los 35 días y no por terneros nacidos; lo que indica que en el presente trabajo no se involucró, como variable de estudio, las pérdidas embrionarias tardías que son otros aspecto que pueden afectar los resultados en un programa de transferencia de embriones.

Con esto se puede decir que las hembras utilizadas como receptoras de embriones, al ser sometidas al protocolo hormonal descrito para esta investigación, respondieron a este, lo que facilitó la presencia de estructuras ovarias como cuerpos lúteos. De igual forma el hecho que la temperatura en la zona del trabajo estuviera entre los límites de confort para la raza brahman, favoreció que los animales no presentaran estrés calórico y nutricional, proporcionando las reservas corporales esenciales, para un adecuado desarrollo ovárico y de los cuerpos lúteos, logrando obtener adecuados niveles de hormonales para mantener los porcentajes de preñez de los embriones hasta el momento que se evaluaron a los 35 días post-trasferencia.

12. CONCLUSIÓN

Los CL de 22 mm obtuvieron mayores tasas de preñez en las hembras de estudio y mejores que los demás diámetros (20, 18 y 16mm)

13. SUGERENCIAS.

- Siempre que se vaya a realizar un trabajo de transferencia embrionaria, se deberá contemplar primero, factores básicos como estatus sanitario de la finca, y nutrición de los mismos (mineralización adecuada).
- Es necesario realizar trabajos en los que se evalúen las diferentes hormonas utilizadas en el protocolo para el control del ciclo estral en la hembra receptora de embriones, con el fin de realizar ajustes para la incrementar la eficiencia, ya que un porcentaje de animales del presente estudio, así como de los trabajos
- Es necesario continuar ampliando el conocimiento acerca de los patrones fisiológicos y respuestas a los tratamientos hormonales para control del ciclo estral, en diferentes grupos raciales, así como en cruces de estos, diferentes etapas fisiológicas, condiciones de manejo, entre otros; para de esta forma direccionar la selección hacia animales eficientes.
- Es importante seguir realizando estudios, en distintas etapas climatológicas, y analizar los cambios que pueden darse, ya sea por estrés calórico u otros factores ambientales.

14. LITERATURA CITADA.

Aller JF, Albeiro RH, Palma GA. (2000): Gestación con embriones producidos in vitro a partir de oocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. Arch Med Vet., 32:33-3

Armstrong DT. (1993): Recent advances in superovulation of cattle. Theriogenology., 39:7-24.

Baruselli PS, Marques MO, Madureira EH, Costa Neto EP, Grandinetti RR., Bo GA. (2001): Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. Theriogenology., 55:157. (Abstract)

Baruselli PS, Martins CM, Sá Filho MF, Nasser LF, Gimenes LU, Madureira EH, Bó GA. (2005): Novos avanços nos tratamentos de doadoras e receptoras de embrião bovino. Sociedade Brasileira de tecnologia de embriões, 33:151-156.

Beal WE, Hinshaw RH. (2000): Synchronization of estrus and ovulation in bovine embryo transfer recipients. <http://www.ashbyvets.com/research/AABPSELECT98.PDF> (20 de mayo de 2016)

Benyei B, Komlosi I, Pécsi A, Pollot G. (2006): The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. Anim Reprod Sci., 93:268-279.

Biondini M, Zangrilli G, Preisseger G, Callejas S. (2011); Efectos de la sal de estradiol y de la duración del tratamiento con progesterona sobre el porcentaje de preñez a la IATF. Inseminación artificial. Rev. Vet., 22: 2, 127-130.

Bó GA. (2000): Dinámica folicular y tratamientos Hormonales para sincronizar la ovulación, en el ganado bovino. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera 22 al 26 de Octubre. ULA-Trujillo.

Bó G, Berfegfet D, Mapletoft, R. (1996): Manipulación de la dinámica folicular en ganado bovino: Su aplicación en programas de Transferencia de embriones. Memorias, II Simposio internacional de reproducción animal. Córdoba, Argentina, 53-68.

Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Mapletoft RJ. (2002a): The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology.*, 57:53-72.

Bó GA, Cutaia L, Tribulo R. (2002b): Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Primera Parte. *Taurus.*, 14:10-21.

Bó GA, Cutaia L, Tríbulo R. (2002c): Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Segunda Parte. *Taurus.*, 15:17-32

Bó GA, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo RJ, Tríbulo H. (2004d): Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus.*, 21:25-40.

Callejas S, De Dominici O, Madero S, Cantallops F, Cabodevila J. (2005). Efecto del CPE administrado al momento de retirar un dispositivo intravaginal con progesterona o 24 hs después sobre el porcentaje de preñez a la IATF. *Anales VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba (Argentina)*, p. 391.

Callejas S. (2010): Fisiología del ciclo estral en bovinos. En *Biotechnología Reproductiva*. 2da ed. Editado por ediciones Reproduc., 35 -59 Argentina.

Callesen H, Greve T, Bak A. (1992): Embryotecnology in dairy cattle breeding. In: Lauria, A., Gandolfi Embryonic development and manipulation in animal production. En: Trends in research and applications. Portland Press, London and Chapel Hill, 207-214.

Cutini A, Teruel M, Cabodevila J. (2000): Factores que determinan el resultado de la trasfereencia no quirúrgica en embriones bovinos. Revista Taurus., N° 7: 28-39.

Demetrio DGB, Santos RM, Demetrio CGB, Vasconcelos JLM. (2007): Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. J Dairy Sci., 90:5073-5082.

Duica AA. (2010): Efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos. Tesis de Maestría en salud animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Duran C, Ortiz J. (2010): Efecto del tamaño del cuerpo lúteo en la tasa de preñez en receptoras de embriones bovinos. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Santa Cruz, Bolivia.

FAO. (2004): *Incorporating Nutrition Considerations into Development Policies and Programmes*. PolicyBrief. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5343e/y5343e00.htm> (30 de julio 2014)

FAO. (2006): World Agriculture towards 2030/2050. Interim report. Global PerspectiveStudiesUnit. Roma, junio de 2006. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/009/a0607e/a0607e00.htm> (30 de julio 2014)

Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. (2004): Follicular development: the role of the

follicular microenvironment in the selection of the dominant follicle. *Journal of Animal Reproduction Science.*, Amsterdam, 82-83:109-126.

Fortune JE. (1993): Follicular dynamics during the bovine estrus cycle: A limiting factor in improvement of fertility. *Journal of Animal Reproduction Science.*, Amsterdam, 33(1-4): 111-125.

Frandsen R. (1976): *Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos*. 2ª ed., Interamericana S.A, D.F México.

Galina HC, Saltiel SA. (1995): *Reproducción de animales domésticos*. 4ª ed., Limusa, D. F, México.

Getty R. (1982): *Anatomía de los animales Domésticos*. 5ª ed., Salvat, España.

Gonella A, Grajales H, Hernández A. (2010): Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Rev. MVZ. Córdoba*, 15(1): 1976-1984.

Gonella-Díaz AM, Holguín G, Montaña D, Valbuena D. (2013): Corpus luteum diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data analysis from 17,521 embryo transfers from a commercial in vitro bovine embryo production program. *Anim. Reprod*, v.10, n.2, p.106-111.

Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, Spencer TE. (2001). Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol Reprod*, 64:1608-1613.

Hafez E. (1989): *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 5ª ed., McGraw- Hill, Carolina, USA.

Hernández FH. (2001): Fertilización in vitro. Reproducción Bovina. C González-Stagnaro. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela., XXVI: 411-426.

Kastelic J, Bergfelt D, Ginther O. (1990): Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, 33(6): 1269-1278.

Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. (1997): Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology*, 47:703-714.

Lagunares M.A. (2014): Efecto de la calidad del cuerpo lúteo (CL) y tiempo de embrionización sobre las tasas de concepción en receptoras Bradford con embriones Angus en transferencia directa. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro. México.

Linneo M, Ortiz J. (2007): Evaluación de diferentes dosis de eCG en un protocolo simplificado de sincronización de celo en vaquillas mestizas receptoras de embriones DIB., B.E., PGF2A., Y ECP. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma "GABRIEL RENÉ MORENO. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia.

Lohouis MM, Smith C, Dekkers JCM. (1993): Results from a dispersed hybrid nucleus programme in dairy cattle. *Anim. Prod.*, 57:369-378.

Lonergan P, Woods A, Fair T, Carter F, Rizos D, Ward F, Quinn K, Evans A. (2007): Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev.*, 19:861-868.

Lonergan P. (2011): Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology.*, 76:1594-1601.

Lu KH, Seidel Jr GE. (2004): Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocyte inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology.*, 62:819-830

MacDonald. (1981): Reproducción y endocrinología veterinaria. 2ª ed., Interamericana, S.A, D.F, México.

Mahecha L, Gallego LA, Peláez F. (2002): Situación actual de la ganadería de carne en Colombia y alternativas para impulsar su competitividad y sostenibilidad. *Rev Col Cienc Pec.*, Vol. 15: 2, 2002.

Mann GE. (2009): Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Anim Reprod Sci.*, 115:296-299.

Mapletoft RJ, Colazo MG, Martinez MF, Kastelic JP. (2003): Ésteres de estrógeno para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con dispositivos con progesterona. V Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina 55-67.

Matute MJ, Eveline, NJ. (2014): Porcentaje de preñez en vaquillas receptoras de embriones sincronizadas con dos diferentes dispositivos a base de progestágenos. (Tesis licenciatura). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras.

Ministerio de Desarrollo Agropecuario. MIDA (2014). Aportes para el desarrollo del sector agropecuario y rural de Panamá desde una política de estado de mediano y

largo plazo. <http://www.mida.gob.pa/upload/documentos/aportesmidasector.pdf>
(16 de Febrero de 2016)

Morris D, Diskin M. (2008): Effect of progesterone on embryo survival. *Animal*, 2:1112-1119.

Nasser TLF. (2006): Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (*Bos indicus*). Tesis de doctorado, FMVZ, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Nasser TLF, Rezende CR, Rezende LF, Bó GA, Baruselli PS. (2006): Sincronização de Receptoras para Transferência de Embriões em Larga Escala.

Noakes DE. (1997): Fertilidad y obstetricia del ganado vacuno. Acribia, Zaragoza, España.

Nogueira É, Cardoso GS, Marques J, Romero H, Dias A, Menezes Í, Vinhas LC, Borges J. (2012): Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(9), 2129-2133. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982012000900022&lng=en&tlng=, Febrero 02, 2016.

Okumu LA, Forde N, Fahey AG, Fitzpatrick E, Roche JF, Crowe MA, Lonergan P. (2010). The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localization of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction.*, 140:143-153.

Ortiz J. (2000): Manual de Transferencia de Embriones Bovinos. Santa Cruz – Bolivia Proyecto de Mejoramiento Genético de Ganado de Carne. 37pp.

Oyuela, L. (2009): Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones producidos in-vitro, en razas cebuinas. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. <http://www.bdigital.unal.edu.co/2663/1/linoandresoyuela.2009.pdf> Activo, (Junio 10 del 2015).

Pérez M, Rodríguez A, Dorado M. (2002): Dinámica Folicular Ovárica en Vacas Repetidoras: Estudio Ecográfico y Perfil de Progesterona. Universidad de Córdoba- España. <http://www.engormix.com/ganaderia-carne/genetica/dinamica-folicular-ovaricavacas-.htm>, (13 de noviembre del 2014).

Ptaszynska M. (2007): Compendium de reproducción animal de Intervet 9ª Edición) (en línea). Sinervia Uruguay/Paraguay. <http://www.sinervia.com/CompendioReproduccion%20Animal%20Intervet.pdf>, (13 de noviembre del 2014).

Rajakoski E. (1960): The ovarian follicular system in sexually mature heifer with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta Endocrinology.*, 34: 7-68.

Randel RD. (1989): LH and ovulation in Brahman, Brahman X Hereford and Hereford heifers. *Journal of Animal Science*, Savoy., 43(1-2):300.

Rowe RF, Del Campo MR, Critsen JK, Ginther OJ. (1980): Embryo transfer in cattle. Non surgical transfer. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 1024–1028.

Sartori R, Rosa G, Wiltbank M. (2002): Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of Dairy Science.*, 85:2813–2822.

Siqueira LG, Torres CA, Amorim LS, Souza ED, Camargo LS, Fernandes CA, Viana JH. (2009): Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci.*, 115:18-28

Spencer TE, Burghardt R, Johnson G, Bazer F. (2004): Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci.*, 82:537-550.

Stroud B, Hasler JF. (2006): Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology.*, 65:65-76.

Tribulo H, Col. (1998): Transferencia de Embriones. Curso de Post -Grado en Reproducción Bovina (IRAC). Córdoba, Argentina, 1–109.

Trowson AO, Rowson LEA, Willadsen SM. (1978): Non surgical transfer of bovine embryos. *Vet. Rec.*, 102, 74.

UNFPA. (2010): Estado de la población mundial 2010. Desde con ictos y crisis hacia la renovación: generaciones de cambio. Fondo de Población de las Naciones Unidas. Nueva York. Disponible en: <http://www.unfpa.org/swp/2010/web/es/index.shtml> (30 de julio 2014)

United Nations (2009): United Nations Department of Economic and Social Affairs/Population Division 47 World Urbanization Prospects: The 2009 Revision. http://esa.un.org/unpd/wup/Documents/WUP2009_Highlights_Final.pdf (30 de julio 2014)

Urrego R, Tarazona A, Olivera M, Camargo O. (2008): Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción in vitro de embriones bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecu;* 21:398-405. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v21n3/v21n3a09.pdf> (julio 10 de 2015)

Urroz C. (2000): Anatomía y fisiología animal. Universidad estatal a distancia. San José, Costa Rica, 200-204.

Uslenghi G, Chayer R, Callejas S. (2010); Efectividad del cipionato de estradiol inyectado al final de un tratamiento con progesterona sobre la eficiencia reproductiva. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba (Argentina). . Rev. vet. 21: 1,55–58. http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/176-Efectividad-Uslenghi.pdf. (julio 10 del 2015)

Vasconcelos J, Sartori R, Oliveira H, Guenther J, Wiltbank M. (2001): Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56(2): 307-314.

Villavicencio, Méndez (2007): Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos, (en línea), México. http://www.interciencia.org/v32_02/93.pdf, (13 de noviembre del 2014).

Wang CK, Robinson RS, Flint AP, Mann GE. (2007): Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during bovine oestrus cycle and their association with progesterone levels. *Reproduction.*, 134:365-371.

Yanagimachi R. (1994): Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil, E. and Neill JD. Raven Press, New York. 1:189-317