



---

# **EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON hCG Y PROGESTERONA SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN RECEPTORAS DE EMBRIONES BOVINOS**

**Octavio Isaza Londoño**

Tesis

Para obtener el grado académico de Magíster en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela para Graduados Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)

Córdoba, 2019

# **EFECTO DEL TRATAMIENTO CON hCG Y PROGESTERONA SOBRE LA TASA DE PREÑEZ EN RECEPTORAS DE EMBRIONES BOVINOS**

**Octavio Isaza Londoño**

## **Comisión Asesora de Tesis**

Director: Med Vet (M.Sc., Ph.D.) Humberto Tribulo.

Codirector: Med Vet ( Esp.,M.Sc.,Ph.D.) Maria Belen Rabaglino.

## **Tribunal Examinador de Tesis**

1. Dr. Andrés Tribulo
2. Med.Vet Jorge Carcedo M.Sc
3. Dr. Jorge Cabodevila

## **Presentación formal académica**

Marzo de 2019

Instituto de Reproducción Animal Córdoba

Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de  
Córdoba



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi gratitud inicialmente al IRAC y a la UNIVERSIDAD DE MANIZALES por su apoyo económico y logístico.

Al Dr HUMBERTO TRIBULO y la Dra BELEN RABAGLINO por sus valiosos aportes para el desarrollo del presente trabajo.

A mi equipo de la UNIVERSIDAD DE MANIZALES y en especial a la Dra. DANIELA VILLEGAS CARDONA por su ayuda constante en las pruebas de campo.

A los doctores CIELO LILIANA MUÑOZ NOREÑA por ser consultora dispuesta y permanente.

A las doctoras MONICA MARCELA RAMIREZ, DIANA MATURANA Y JULIANA BEDOYA por su dedicación y compromiso para la producción de embriones in vitro.

## **DEDICATORIA**

A PATRICIA mi valiente esposa por creer siempre en mí y apoyarme de manera constante  
y decidida.

A mis hijos JULIANA, ANDRÉS y CATALINA por ser la fuerza y el impulso para sacar  
adelante todo lo propuesto.

A la memoria de mis padres, a mi entrañable familia y amigos.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar si la aplicación intrauterina de progesterona disuelta en un polímero en el momento de la transferencia del embrión realizada en novillas o la administración de 2000 UI de hCG cuatro días antes de la transferencia del embrión, repercuten en las tasas de preñez frente a un grupo Control que no recibe ningún tipo de suplementación exógena. Para este efecto se utilizaron 3 grupos, el Grupo Control (n=100) que no tuvo ninguna intervención, el Grupo hCG (n=086) al cual se le aplicaron 2000 UI de hCG (hCG; Fertivet Chalver, Colombia) cuatro días antes de la transferencia y el grupo Polímero (n=100) al que se le adicionó a la pajilla que contenía el embrión producido in vitro, una columna con 2,5 mg de progesterona disueltos en un biopolímero. Los tres grupos fueron sometidos a un proceso de sincronización que iniciaba el Día 0 con la inserción de un dispositivo intravaginal con progesterona (DIB 0,5 g, Syntex SA, Argentina) y 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Benzoato de Estradiol, Syntex, Argentina). En el Día 8 se removieron los DIB y se administró 500µg de Cloprostenol (PGF2 $\alpha$ ; Ciclase DL, Syntex, Argentina), 0,5 mg de Cipionato de estradiol (CPE; Cipyosin, Syntex, Argentina), 400 UI de gonadotrofina Coriónica equina (eCG; SincroeCG, Ourofino, Brasil). El Día 17 se transfirieron los embriones. Todas las hormonas se administraron por vía intramuscular profunda con agujas calibre 18 x 1.5 y jeringas de 3 y 5 ml. Se tomaron muestras de sangre en el 7 % de las receptoras, para medir la cantidad de progesterona el día de la transferencia y los días 14 y 21 posteriores a la misma. Las muestras fueron tomadas a 7 animales del Grupo Control, 7 del Grupo Polímero y 8 del Grupo hCG.

En la presente investigación, se observó que la tasa de preñez del grupo hCG fue superior (40,7%) al grupo Control (30,0%) y al grupo Polímero (20,0%), demostrando que la aplicación de progesterona intrauterina puede tener un efecto negativo sobre la tasa de preñez. El análisis estadístico demostró que la única variable que influyó en el porcentaje de preñez fue el grupo. Ninguna de las otras variables influyó, y no hubo efecto de las interacciones.

La formación de cuerpos lúteos accesorios que pudieron ser detectados por ecografía diagnosticada el día de la transferencia, fue escasa, de 286 hembras transferidas

sólo se diagnosticaron 6 cuerpos lúteos accesorios, equivalente al 2% de los animales transferidos.

En cuanto a los niveles de progesterona en sangre se evidenció una caída en los niveles de esta hormona hacia el día 14 posterior a la transferencia del embrión, y luego un ascenso en los niveles de la misma hacia el día 21. Lo anterior puede constituir una tendencia interesante a incrementar la progesterona mediante la aplicación intrauterina, aunque no es concluyente dada la varianza presentada en los resultados y el tamaño de la muestra. En promedio el Grupo Polímero presentó unos niveles inferiores (6,2 ng/ ml) el día 0 o día de la transferencia del embrión, a partir del día 14 se observó un aumento significativo (7,8 ng/ ml). Los grupos hCG y Control tuvieron un nivel superior (10 a 12 ng/ml) en el día 0 y una caída más significativa hacia el día 14 (6,0 a 7,0 ng/ml) y se mantuvieron los mismos niveles hasta el día 21.

**Palabras clave:** Progesterona, hCG, Transferencia de embriones, tasa de preñez.

## ABSTRACT

The objective of this research was to determine whether the intrauterine application of progesterone dissolved in a polymer at the moment of the embryo transfer in heifers and the application of 2000 IU of hCG four days before the embryo transfer, affect the pregnancy rates against a control group that does not receive any type of exogenous supplementation.

For this effect, 3 groups were used, Group 1 or control (n=100), group that did not have intervention, Group 2 or hCG group (n=086) to which 2000 IU of hCG (hCG, Fertivet, Chalver, Colombia) were applied four days before the embryo transfer and Group 3 or Polymer Group (n=100) to which was added to the straw containing the embryo produced in vitro, a column with 2.5 mg of progesterone dissolved in a biopolymer, the three groups underwent a synchronization process that began on Day 0 with the insertion of an intravaginal device with progesterone (DIB 0.5 g, Syntex SA, Argentina) and 2 mg of estradiol benzoate (BE, Benzoate of Estradiol, Syntex, Argentina). On Day 8, the DIBs were removed and 500 µg of Cloprostenol (PGF2 $\alpha$ , Cyclase DL, Syntex, Argentina), 0.5 mg of estradiol cypionate (CPE, Cipyosin, Syntex, Argentina), 400 IU of equine chorionic gonadotropin were administered (eCG; SincroeCG, Ourofino, Brazil). On Day 17 the embryos were transferred. All hormones were administered by deep intramuscular injection with 18 x 1.5 gauge needles and 3 and 5 ml syringes. Blood samples were taken in 7% of the recipients, to measure the amount of progesterone on the day of the transfer and on days 14 and 21 after the same. The samples were taken from 7 animals of the Control Group, 7 animals from the Polymer Group and 8 from the hCG Group.

In the present investigation, it is observed that the pregnancy rate of group 2 or hCG Group was higher (40.7%) to group # 1 or Control Group (30%) and to group # 3 or Polymer Group (20%), demonstrating that the application of intrauterine progesterone can have a negative effect on the pregnancy rate. The statistical analysis showed that the only variable that influenced the percentage of pregnancy was the group. None of the other variables influenced, and there was no effect of the interactions.

The formation of accessory corpus luteum that could be detected by ultrasound diagnosed on the day of the transfer were scarce. Of 286 transferred females, only 6 accessory luteal bodies were diagnosed, equivalent to 2% of the transferred animals.

Regarding the levels of progesterone in blood, a drop in the levels of this hormone towards the 14th day after the embryo transfer is evidenced, and then a rise in the levels of the same towards day 21. The previous thing can constitute an interesting tendency to increase progesterone through intrauterine application, although it is not conclusive given the variance presented in the results and the sample size.

On average, the Polymer Group presented lower levels (6,2 ng/ml) towards day 0 or day of the embryo transfer, from day 14 it presented a significant increase (7,8 ng/ml). The hCG and Control Groups had a higher level (10 to 12 ng/ml) on day 0 and a more significant fall towards day 14 ( 6,0 to 7,0 ng/ml) and the same levels were maintained until the day 21.

**Key words:** Progesterone, hCG, embryo transfer, pregnancy rate.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
CAPÍTULO 1.....	12
INTRODUCCIÓN .....	12
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS .....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos .....	21
CAPÍTULO 2.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
Predios y animales .....	22
Grupo Control .....	27
Grupo hCG.....	28
Grupo Polímero.....	29
Toma y procesamiento de muestras .....	30
CAPÍTULO 3.....	32
RESULTADOS.....	32
Concentraciones de progesterona en sangre los días 0, 14 y 21.....	38
CAPÍTULO 4.....	41
DISCUSIÓN .....	41
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	48
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA.....	50
CRONOGRAMA.....	59
COSTOS DEL PROYECTO.....	61

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Predios y las condiciones climáticas .....	22
Tabla 3.1 Tasa de preñez en los grupos experimentales.....	32
Tabla 3.2 Distribución por grupo con preñez positiva .....	33
Tabla 3.3 Incidencia del toro.....	34
Tabla 3.4 Estructuras halladas por grupo .....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Producción In Vitro .....	25
Figura 2.2 Transferencia de embriones .....	26
Figura 2.3 Receptoras de hembras Limousin nacidas por FIV en la Hacienda Pino Hermoso .....	27
Figura 2.4 Tratamiento de sincronización.....	28
Figura 3.1 Donadoras y preñez por grupo.....	33
Figura 3.2 Tasa de preñez según la ubicación geográfica .....	37
Figura 3.3 Niveles de p4 los días 0, 14 y 21 .....	38
Figura 3.4 Efecto del grupo sobre los niveles de progesterona.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

.....	Probabilidad de preñez
.....	Cambio de la probabilidad entre la variable y la probabilidad de preñez
.....	Variables que hacen parte del modelo descriptivo
LR.....	(likelihoodrate) coeficiente de verosimilitud

TE..... Transferencia de embriones  
hCG..... Gonadotropina Coriónica Humana  
PIVE .....Producción In Vitro de Embriones  
CL..... Cuerpo lúteo  
IA..... Inseminación artificial  
FIV.....Fecundación In Vitro

# **CAPÍTULO 1.**

## **INTRODUCCIÓN**

Los estudios realizados alrededor del ciclo estral bovino, así como los avances obtenidos respecto de técnicas y métodos para realizar procesos de transferencia embrionaria, han posibilitado el logro de indicadores positivos en materia de tasas de preñez. La transferencia de embriones (TE), viene siendo implementada hace cuatro décadas, con importantes efectos en el aumento del número de embriones y terneros, así como en la mejora de las características deseables del ganado, debido a que dicho método permite emplear más eficientemente el potencial genético, tanto de la hembra como del macho, lo que deriva en mayores posibilidades de desarrollar iniciativas de mejoramiento genético (Palma, 2001). Adicionalmente, la TE ha comprobado tener otros beneficios asociados, ha generado utilidades alrededor de la importación y exportación de material genético así como su almacenamiento a largo plazo, el control de enfermedades no transmisibles y el favorecimiento de cambios genéticos (Kunkel, 2005).

Estos y otros provechos, han hecho de la producción in vitro de embriones, una de las técnicas más utilizadas y promisorias en materia de reproducción bovina debido a su positivo impacto en la productividad de los hatos y en el incremento de los niveles de rentabilidad de la industria ganadera, ya que su uso ha sido ampliamente extendido con fines comerciales (Vivanco, 2002). Comparativamente con los resultados de la producción de embriones in vivo, la producción in vitro (PIVE) puede producir cerca de 3,4 veces más embriones y alrededor de 3,2 veces más preñeces en un término de tiempo de 60 días (Mapletoft y Hasler, 2005).

La técnica PIVE se lleva a cabo en tres etapas: maduración in vitro de los ovocitos, que son extraídos de los ovarios por punción folicular, la fertilización in vitro de los

ovocitos madurados, y finalmente, el cultivo in vitro de los embriones (Fair et al. 2000; 2001). En el éxito del proceso influyen aspectos como valor genético del semen y las técnicas de laboratorio utilizadas, razón por la cual, es un proceso que requiere de evaluaciones periódicas.

### Suplementación de progesterona

Estudios realizados han llevado a algunos autores a considerar que las bajas concentraciones de progesterona, en el primer mes de gestación, inciden en la aparición de pérdidas embrionarias tempranas (Bridges et al. 2000; Inskeep, 2004) en razón a que generan mayor pulsatilidad de la hormona luteinizante (LH) que puede ser estimulante del crecimiento folicular, este último, deriva en la producción de mayores concentraciones de estradiol  $17\beta$ , que puede ser nocivo para el embrión si se da en la fase luteal (Bridges et al. 2000; Inskeep, 2004). Por lo que mayores concentraciones de progesterona, favorecen un desarrollo embrionario adecuado. Estudios realizados sobre suplementación con progesterona después de la inseminación, reportaron un moderado incremento en el porcentaje de concepción (5,2%) y cuando el tratamiento se iniciaba el día 6 luego de la inseminación, hubo un incremento significativo en la concepción del 10% (Mann y Lamming, 1999).

En este orden de ideas, los tratamientos orientados a aumentar las concentraciones de progesterona en la fase luteal de la vaca, se realizan cada vez con más frecuencia, tanto para TE In Vivo, como In vitro, siendo sus efectos positivos en el desarrollo del blastocito, el mantenimiento de la gestación con mejores tasas de preñez, algunas de las razones para llevarlos a cabo. De acuerdo con Lonergan, et al. (2013) hay una gama amplia de tratamientos que pueden ser utilizados con este fin, entre ellos, los que aumentan las concentraciones endógenas después de la IA, los que aumentan la función endógena del CL existente, los que estimulan la formación de un CL accesorio o, aquellos que suplementan la progesterona directamente a través de inyección o la colocación de dispositivos intravaginales.

El papel de la progesterona y sus efectos positivos, ha sido asociado directamente a la función endometrial, ya que estudios como los de Clemente et al. (2009); en los que se realizó la adición de progesterona al medio de cultivo, en procesos de producción de embriones in vitro y técnicas de transferencia de embriones in vivo, dicha adición no presentó ningún efecto sobre la formación del blastocito, así como tampoco en la elongación, luego de realizarse la transferencia a receptoras sincronizadas. Esto cobra sentido si se tiene en cuenta que, hasta la etapa del blastocito, el embrión no requiere contacto con el tracto reproductivo de la madre, de allí que pueda desarrollarse in vitro. Mientras que la post-eclosión e implantación del conceptus, sí requieren de histotrofos, sustancias presentes en la luz uterina que provienen del endometrio y que son necesarias para el crecimiento y desarrollo del embrión.

Otros autores en cambio, (Mann et al. 1999; Thatcher et al. 2001; Okuda et al. 2002), plantean que las concentraciones de progesterona plasmática tienen una correlación positiva con la producción de IFN- $\tau$  (interferón trofoblástico) por el conceptus, proponiendo que a mayor concentración de progesterona, el embrión cuenta con un medio más propicio para su desarrollo; por el contrario, cuando los niveles de progesterona son insuficientes, el desarrollo embrionario es más lento (Mann y Lamming, 1999). De allí la importancia de la progesterona, en la medida en que se considera crucial para el mantenimiento de la gestación (Spencer et al. 2007; Lonergan, 2011; Bazer, 2013) porque su presencia en bajos niveles se asocia a un reconocimiento de la gestación por parte de la madre, mucho más débil.

Estudios como los de Lonergan et al. (2013) han identificado que las vacas que han mostrado embriones con mejor desarrollo, tienen mayores concentraciones de progesterona. Otro asunto que evidencia la importancia de la progesterona es la forma como se ve afectada la capacidad del útero de una vaca lactante para apoyar el desarrollo embrionario (Rizos et al. 2010), lo que no es evidente en vacas posparto no lactantes ni en novillas, situación ésta que pudiera estar asociada a las bajas concentraciones de

progesterona plasmática y a entornos luminales no adecuados (Maillo et al. 2012). Si bien se ha demostrado que el conceptus juega un papel importante en las funciones endometriales, dado que se ha evidenciado que el endometrio de la vaca responde diferente a cada embrión (Bauersachs et al. 2009; Mansouri et al. 2009), también lo es que las condiciones del ambiente uterino, entre estas la presencia suficiente de progesterona, apoyan el desarrollo adecuado del concepto.

En los inicios del desarrollo embrionario, el embrión presenta una dependencia total de las secreciones uterinas y oviductales, y hay que recordar que éstas son reguladas por la progesterona (Roberts & Bazer, 1988), por este motivo se han adjudicado algunas fallas de la concepción a las irregularidades identificadas en la función del cuerpo lúteo (Mann & Lamming, 1999). No obstante lo anterior, los resultados de los estudios en los que se ha buscado incrementar las tasas de preñez a través de tratamientos en los que se administró progesterona, han tenido comportamientos muy variables.

Según reportes de Robinson et al. (1989) la administración de progesterona en vacas lactantes que se consideraban subfértiles, a través de un dispositivo intravaginal que libera progesterona que fue insertado entre el día cinco y diez después de la inseminación, encontraron que las vacas intervenidas, presentaron un incremento significativo en el porcentaje de concepción, mientras que otro estudio como el de Macmillan et al. (1991) que realizaron un experimento similar, no mostró resultados favorecedores en vacas y vaquillas.

La administración de progesterona se usa, entre otros motivos, porque se ha identificado que uno de los aspectos que afecta las tasas de preñez es la incapacidad del conceptus de impedir la regresión del cuerpo lúteo (Robinson et al. 1989). Albihn et al. (1991) identificaron en vaquillas repetidoras una menor capacidad para evitar la regresión del cuerpo lúteo, en este sentido, la inhibición de secreciones de prostaglandina, pudieron mejorar las tasas de preñez, dado que le darían al conceptus más tiempo para optimizar su

desarrollo y establecer de forma más eficaz el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación.

En un experimento realizado por Flores, et al. (2013), se intentó probar si con una inyección de P4 en el día cinco posinseminación lograba incrementar el porcentaje de concepción en vacas lecheras. El experimento mostró que las vacas que recibieron el tratamiento y las del grupo testigo, no mostraron diferencia alguna en el porcentaje de concepción, sin embargo, las vacas que regresaron al estro, mostraron mayor concentración de progesterona y un porcentaje de concepción más alto que en el grupo control, lo que llevó a concluir que la administración de progesterona no afectó el porcentaje de concepción en el primer ciclo, pero sí en el ciclo subsiguiente.

Según Tovío et al. (2008) la P4 estimula en el útero las funciones necesarias para un desarrollo embrionario temprano ya que es la responsable de cambios cuantitativos y cualitativos en pos de generar un ambiente propicio para la placentación y el desarrollo fetal, esto se da por la secreción de al menos 10 proteínas. Se deriva de lo anterior, que deficiencias de P4, podrían generar condiciones adversas para el crecimiento, mantenimiento y supervivencia del conceptus. Por esta razón se han diseñado estrategias hormonales que no causen luteólisis, dirigidas a que la capacidad secretora de P4 por el cuerpo lúteo sea eficiente, es decir, que se dé de forma oportuna, para garantizar precisamente un ambiente uterino adecuado para el embrión (Binelli et al, 2001).

Es un poco controversial el tema de la progesterona en relación a la viabilidad del embrión de acuerdo al compromiso directo en la función del cuerpo lúteo. Por un lado, el aumento de la concentración de P4 estimula el alargamiento del concepto (Garrett et al. 1988a; Satterfield et al. 2006; Carter et al. 2008) a través de cambios bien caracterizados inducidos en el transcriptoma endometrial (Forde et al. 2009, 2011b) y los cambios asociados en el histótrofo (Costello et al. 2010; Hugentobler et al. 2010).

A la inversa, existe evidencia convincente en la literatura de que la administración de P4 al principio del ciclo puede comprometer la función de la CL, lo que finalmente conduce a la luteólisis y la pérdida de embriones (Ginther 1970; Garrett et al. 1988a; Burke et al. 1996; Pope et al. 1995; Van Cleeff et al. 1996).

Puede ser que la estrategia dirigida a estimular el desarrollo del CL de manera endógena (p. ej., la manipulación del desarrollo del folículo preovulatorio (Wiltbank et al. 2011) o la administración de agentes luteotróficos como la hCG (De Rensis et al. 2010; Lonergan, 2011; Rizos et al. 2012) sea la más efectiva en lugar de suplementar con P4 exógena.

#### Formación de CL accesorios con hCG

Mientras más grande sea el CL mayor es su capacidad de secretar progesterona (Baruselli et al. 2010) la cual, cómo se ha venido planteando, ha sido asociada a mayores tasas de preñez. Además, participa en el mantenimiento de la gestación y el desarrollo embrionario adecuado, lo cual supone que las estrategias orientadas a inducir el crecimiento del folículo dominante previo a la ovulación, así como la estimulación del aumento del CL, pudieran traducirse en un aumento en las tasas de preñez (Baruselli et al. 2010).

Una de las técnicas para lograrlo, ha sido la administración de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) para inducir la ovulación de un folículo dominante y formar un CL accesorio. En un estudio realizado por Nascimento et al. (2013), evaluaron los efectos del tratamiento de hCG post-IA sobre la fertilidad en vacas lecheras lactantes y de forma posterior y por separado, se realizó el mismo análisis en vacas Holstein lactantes; utilizando grupos control de vacas que no fueron tratadas. Se reportó que en general, la administración de hCG aumentó la tasa de preñez por inseminación artificial en un 3,0%. En la prueba de campo posterior realizada a las vacas Holstein lactantes, también aumentó la tasa de preñez por IA en las vacas tratadas con hCG (40,8%, (596 / 1,460) sobre el grupo

control (37,3%, 566 / 1,519), mostrando además, que el efecto positivo de la hCG estaba restringido a vacas de primera lactancia.

Otro estudio realizado por Stevenson et al. (2007) reportaron que uno de los efectos de la administración de hCG al día 5-7 luego de la inseminación, fue el aumento en el volumen y diámetro del CL, lo cual indicaría que causa hiperplasia y/o hipertrofia de las células luteales. No obstante, su administración posterior al día 7, con el fin de reducir pérdidas embrionarias, no logró modificar la tasa de preñez evaluada a los 30 días de la inseminación. En un trabajo posterior, los autores utilizaron 2500 UI de hCG 29 días luego de la inseminación, y si bien se presentó un aumento del tamaño del CL al día 35 y de las concentraciones de progesterona, se evidenció un aumento de pérdidas embrionarias, los cuales pueden ser atribuibles a un exceso de progesterona que puede derivar en una función luteal irregular (Pérez, 2013).

No obstante los variables resultados de la aplicación de hCG, esta hormona tiene una amplia utilización, entre otras razones, se ha comprobado su capacidad de inducir la superovulación y de sincronizar el celo (Murphy, 2012). Sin embargo, seguramente el principal efecto de las gonadotropinas es la acción luteinizante, así como su facultad de transformar el cuerpo lúteo estral en gestacional, responsable de producir las hormonas para que la preñez siga su curso (Dogi, 2005). Estudios han demostrado que con la aplicación de hCG en el día 7 posterior al proceso de inseminación artificial, se produjo la estimulación de CL accesorios, y en consecuencia, se redujo la mortalidad embrionaria vacuna (Rajamahendran y Sianangama, 1992).

Un ambiente uterino inadecuado se da muchas veces por una comunicación inapropiada entre el conceptus y el útero, provocando que las señales de preñez al organismo materno no se den de forma eficiente y así puedan generarse los cambios necesarios para mantener la gestación (Gómez et al. 2008). Dicha comunicación es necesaria para que se dé el reconocimiento materno, proceso fisiológico por medio del cual el embrión informa a su madre de su presencia mediante señales moleculares, evitando el

mecanismo luteolítico y garantizando la producción de progesterona para el mantenimiento de la preñez (Gómez et al. 2008).

Se realizaron dos experimentos con el fin de establecer si la aplicación de un tratamiento con (hCG) al realizar el proceso de inseminación artificial, mejora la función del CL, encontrando que después del tratamiento, las concentraciones de progesterona fueron similares, tanto en el grupo control como en el tratado con hCG (Morales Roura et al. 1998). Los autores tampoco encontraron diferencia en el porcentaje de concepción de ambos grupos. Sin embargo, cabe mencionar que este experimento fue realizado en vacas repetidoras, puesto que, en otras condiciones, se han encontrado resultados diferentes (Morales Roura et al. 1998). En otro estudio encontraron en vacas bajo estrés calórico que la administración de GnRH durante la inseminación, generó un mejoramiento de la función del CL, así como de la fertilidad (Ryan et al. 1991).

Contrario a estos hallazgos, Martínez et al. (2013), encontraron que la aplicación de hCG (1500 UI) al momento de la transferencia en vacas de doble propósito receptoras de embriones, mostraron una diferencia significativa en los porcentajes de gestación frente al grupo testigo, demostrando que el tratamiento con hCG al momento de transferir al embrión incrementa el porcentaje de preñez en las vacas transferidas.

Según Yan et al. (2016), la progesterona juega un papel fundamental en la etapa temprana de la gestación, indicando que esta hormona produce un aumento general en la tasa de probabilidades de preñez. Estos autores realizaron un estudio de metaanálisis con un modelo de efectos aleatorios binarios univariados en 84 tratamientos específicos informados en 53 publicaciones que incluyeron vacas de control (n=9905) y tratadas con progesterona (n=9135). Aunque los resultados de los estudios individuales mostraron amplias variaciones (de -40% a + 50% de cambios puntuales), el tratamiento con progesterona produjo un aumento general en la tasa de probabilidades de preñez (OR=1,12; P <0.01).

## **HIPÓTESIS**

La administración intrauterina de P4 el día de la transferencia embrionaria tiene un efecto similar o mayor sobre la tasa de preñez, que el aumento indirecto de P4 mediante la aplicación de hCG cuatro días antes de la transferencia embrionaria en novillas receptoras.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar si la aplicación intrauterina de progesterona disuelta en un polímero en el momento de la transferencia embrionaria y la aplicación de hCG cuatro días antes de la transferencia del embrión, aumentan la tasa de preñez frente a un grupo control que no recibe ningún tipo de suplementación exógena.

## **Objetivos específicos**

- Determinar si la tasa de preñez en novillas receptoras de embriones, en cada uno de los grupos experimentales, está relacionada con el biotipo de las mismas.
- Comprobar si la donadora de ovocitos tiene incidencia sobre la tasa de preñez en los distintos grupos experimentales.
- Determinar si el semen del toro usado en el proceso de fertilización in vitro incide sobre la tasa de preñez en los distintos grupos experimentales.
- Estimar si la ubicación geográfica de la finca, tiene relación con los resultados alcanzados en cuanto a tasas de preñez en los grupos experimentales.
- Establecer qué diferencia existe en los tres grupos experimentales en relación a la estructura encontrada en los ovarios en el momento de la transferencia.
- Determinar las concentraciones de Progesterona en sangre (ng/ml) en el 7% de los animales transferidos.

## CAPÍTULO 2.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Predios y animales

El presente trabajo se realizó en 13 predios ubicados en el Eje Cafetero Colombiano dedicados a la producción de leche, carne y algunas ganaderías de doble propósito. Cuatro de los predios correspondieron a trópico alto por encima de 1800 msnm y el resto de trópico medio y bajo por debajo de esta altura.

Tabla 2.1. Predios y condiciones climáticas en los mismos

PREDIO	UBICACIÓN	ALTURA MSNM	TEMPERATURA GRADOS °C	% HUMEDAD
EL ALTO	Neira Caldas	2100	12	75%
LOS ALPES	Neira Caldas	2100	12	75%
BELGICA	Neira Caldas	1900	14	65%
PINO HERMOSO	Salento Quindio	2050	20	72%
VARGAS	Palestina Caldas	1050	24	70%
LA RUIDOSA	Palestina Caldas	1050	24	70%
SORRENTO	Arauca Caldas	1050	25	70%
MORAVITO	Chinchina Caldas	950	25	65%
EL PORTAL	Manizales Caldas	2100	14	80%
PLAYA RICA	Chinchina Caldas	1400	24	70%
LA PAILA	Irra Risaralda	840	26	74%
LA ESPERANZA	Mariquita Tolima	550	27	58%
PUERTO RICO	Mariquita Tolima	490	29	58%

Las receptoras de embriones fueron producto de cruzamiento de Bos Indicus por Bos Taurus. Dichos animales se encontraban a libre pastoreo, sin suplementación y consumo voluntario de sal mineralizada y agua.

En todos los trabajos se realizaron visitas a los predios para realizar los siguientes procesos:

Visita de evaluación y vacunación

Evaluación de calidad seminal

Visita de sincronización

Fertilización in vitro

Visita de transferencia

Visita de diagnóstico inicial y reprogramación de receptoras.

Para la selección de las novillas receptoras solo se tuvo en cuenta que tuvieran al menos el 70% del peso adulto (entre 320 y 380 kilos de peso vivo), cruces de razas europeas e indicas y que estuvieran en buenas condiciones físicas y sanitarias. No se calificó estado corporal, se evaluaron previamente a la sincronización pero no se tuvo en cuenta calibre de cuernos uterinos o ciclicidad para ser sometidas al tratamiento de sincronización. Para efectos de la investigación se conformaron tres grupos, un primer grupo que no recibió ningún tipo de tratamiento, denominado grupo Control; un segundo grupo al que le fue aplicado hCG 4 días antes de la transferencia y finalmente, el un tercer grupo al que se le realizó una adición de P4.

En los tres grupos se partía de novillas de receptoras y se escogían al azar entre 3 - 6 novillas para aplicar la hCG (Sincroecg®Ourofino Brasil), 4 días antes de la transferencia de los embriones, igualmente, se determinaban que, igual número de novillas iban a formar parte del grupo Control. Si por alguna circunstancia una o varias novillas que se escogían al azar el día de la transferencia para ser incluidas en el grupo Polímero y no eran aptas para ser transferidas pues no tenían un CL, ésta o éstas eran remplazadas por otra u otras, que cumplieran con esta condición y completamente al azar entre las que

quedaran disponibles, y que no formaban parte del grupo Control ni del grupo hCG. Se midieron los diámetros verticales y horizontales de los CL en el momento de la transferencia sacando un promedio de las dos medidas y se categorizaron en CL 2, los que alcanzaron una medida promedio entre 15 y 20 mm y en CL3, los que alcanzaron una medida de 20 o más mm. Para dichas mediciones se usaron los ecógrafos Mindray DP10 Vet (China) y un Aloka Prosaund 2 (Japón), los dos con sondas lineales y en frecuencia de 5.0 MHz. Los animales fueron manejados, en su gran mayoría, en calcetas y en muy pocos predios se disponía de brete.

En todas las receptoras y donantes de ovocitos, se hizo una revisión previa del plan sanitario, para enfermedades de control obligatorio, y muy especialmente, en aquellas que son de orden reproductivo. Para el control de enfermedades reproductivas se aplicaron dos dosis de Bovisan Total (Laboratorios Virbac) 5 ml subcutáneo, con diferencia de 23 días entre las aplicaciones antes de iniciar el tratamiento de sincronización. Las novillas que se confirmaban preñadas, recibían una dosis de Bovisanlepto 8 (Laboratorios Virbac) a los 5 meses de gestación.

En los tres grupos, la aspiración folicular (Ovum Pick up; OPU) se realizó el día 9 de iniciado el protocolo de sincronización de receptoras, ese mismo día los ovocitos eran enviados al laboratorio y la fertilización de los mismos se realizaba aproximadamente a las 20 horas de haber sido colectados para pasar luego al proceso de cultivo.

Se utilizaron un total de 18 toros de razas Gyr, Holstein, Brahman, Limousin, Jersey, Bon, Ayrshire en 28 trabajos realizados en 13 predios ubicados en el Eje Cafetero Colombiano.

Se tomaron muestras de sangre en el 7% de las receptoras transferidas a similar número de animales de los 3 grupos de estudio para determinar los niveles de progesterona, el día de la transferencia del embrión y los días 14 y 21 posteriores a la misma.



Figura 2.1. Producción In Vitro



Figura 2.2. Transferencia de embriones



Figura 2.3. Receptoras de hembras Limousin nacidas por FIV en la Hacienda Pino Hermoso

### **Grupo Control**

Este grupo experimental estaba constituido entre 3 y 6 animales escogidos al azar en la visita de evaluación previa para cada trabajo, en total se transfirieron 100 novillas que no recibieron ningún tipo de suplementación hormonal exógena.

Las receptoras fueron sometidas a un tratamiento de sincronización que iniciaba el Día 0 con la inserción de un dispositivo intravaginal con progesterona (DIB 0,5 g®, Syntex SA, Argentina) y 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Benzoato de Estradiol®, Syntex, Argentina). En el Día 8 se removieron los DIB y se administró 500µg de Cloprostenol (PGF2α; Ciclase DL®, Syntex, Argentina), 0,5 mg de cipionato de estradiol (CPE; Cipyosin®, Syntex, Argentina), 400 UI de gonadotrofina Coriónica equina (eCG;

SincroeCG®, Ourofino, Brasil). El Día 17 se transfirieron los embriones. Todas las hormonas se administraron por vía intramuscular profunda con agujas calibre 18 x 1.5 y jeringas de 3 y 5 ml.

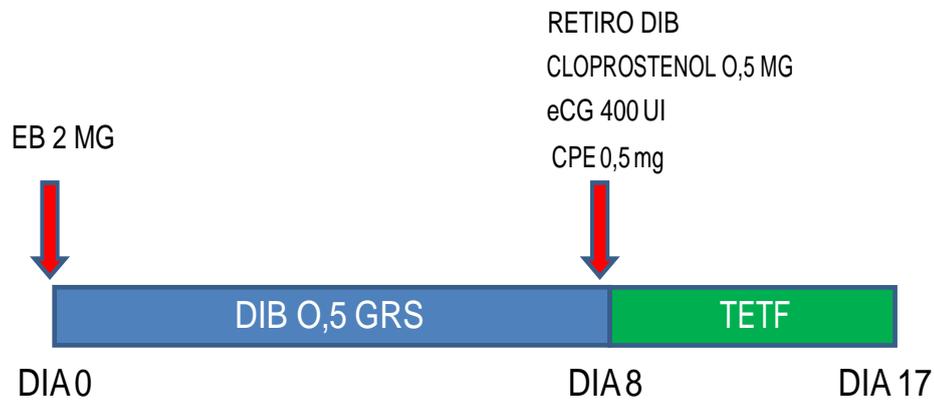


Figura 2.4. Tratamiento de sincronización

Todas las receptoras de este grupo pertenecían a diferentes predios, y eran transferidas de manera simultánea con los otros grupos experimentales. Dicho experimento se realizó de forma paralela en grupos de receptoras de entre 15 y 25 animales, escogiendo de este grupo entre 3 a 6 animales. Todas las receptoras fueron evaluadas por palpación rectal y ultrasonografía el día de la transferencia para determinar la presencia o no de CL y se categorizaron así: CL2 (CL entre 15 y 20 mm) o CL3 (CL de 20 mm o más), realizando la medición del mismo y determinando su calidad, especialmente, si era o no cavitario, y en qué porcentaje aproximado. Luego, se aplicó a la receptora una anestesia epidural con Xilocaina al 2%; se procedió a transferir el embrión por delante de la curvatura mayor en el cuerno uterino correspondiente al ovario que poseía el CL.

## **Grupo hCG**

En este grupo se aplicaron 2000 UI de hCG (hCG; Fertivet®, Chalver, Colombia) cuatro días antes de la transferencia entre 3 y 6 animales por trabajo, escogidas en el momento de la evaluación previa. Se hizo la aplicación en 100 novillas de las cuales 86 fueron transferidas y 14 no respondieron al tratamiento de sincronización para poder ser transferidas la metodología empleada fue igual para todos los grupos de estudio.

## **Grupo Polímero**

Cabe aclarar que las receptoras de este grupo eran escogidas completamente al azar, el día de la transferencia entre las novillas que no habían sido seleccionadas para el grupo Control o el grupo hCG que fueron escogidas durante la visita de evaluación. A diferencia de los grupos anteriores, el día de la transferencia, se escogieron al azar un número de novillas de acuerdo con el tamaño total del grupo y que cumplieran con las condiciones para ser transferidas con las pajillas que contenían el polímero con la adición de P4, se hizo un vaciado parcial de la pajilla y luego, a aproximadamente dos centímetros de distancia del extremo ovárico del cuerno uterino, se vació la columna que contenía el polímero de P4, se utilizó un sistema de bloqueo del émbolo de la pistola, para controlar su recorrido y conocer el momento en que el mismo estaba enfrentado a la columna del biopolímero. En este grupo se procedió empacando el embrión producido por FIV, en una pajilla que contenía el medio de transferencia y la última columna en el empaque, estaba constituida por el biopolímero con la adición de 2,5 mg de progesterona.

## Toma y procesamiento de muestras

Las muestras de sangre se tomaron por punción de la arteria o vena coccígea, en tubos tapa roja sin aditivos ni heparina. Dichas muestras fueron tomadas en campo y transportadas al laboratorio a una temperatura de 5 grados centígrados, fueron centrifugadas dentro de un máximo dos horas de haber sido obtenidas, la centrifugación se realizó a 3000 RPM durante 15 minutos. Se ejecutaron luego los siguientes pasos:

1. Se formatearon los pozos de la microplaca para cada muestra.
2. Se depositaron 0,025 ml del suero en referencia en cada pozo.
3. Se adicionaron 0,050 ml de reactivo trazador de progesterona en cada pozo
4. Se adicionaron 0,050 ml de reactivo de biotina de progesterona a todos los pozos.
5. Se cubrieron las muestras y se incubaron durante 60 minutos.
6. Se decantaron los contenidos de la placa y se seca con papel absorbente.
7. Se lavó luego la placa durante 5 veces con 350 micro litros de buffer de lavado, decantando y aspirando
8. Se adicionó 0,100 ml de solución reactivo de señal de trabajo a todos los pozos
9. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 5 minutos.
10. Se leyeron las unidades relativas de luz de cada pozo con un lector de microplaca para quimioluminiscencia por 0,5 a 1 segundo

## **Análisis estadístico**

Para poder determinar el efecto de las distintas variables sobre los porcentajes de preñez se analizaron los datos por regresión logística, utilizando el PROC GLINMIX de SAS, con el animal tratado como efecto aleatorio. El modelo para la proporción de preñez incluyó el efecto del grupo más el resto de las variables (raza de la donante, receptora, ubicación de la finca, estructuras presentes en el ovario), y sus interacciones.

Los resultados de las concentraciones de progesterona al día 0, 14 y 21 post-transferencia se analizaron como medidas repetidas en el tiempo, en un modelo mixto utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS versión 9.2 para Windows, SAS Institute, Cary, NC, EUA), Incluir cita en la Bibliografía considerando el animal como efecto aleatorio.

Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo, mientras que un valor de  $0,05 < p < 0,1$  fue considerado una tendencia.

## CAPÍTULO 3.

### RESULTADOS

Los resultados generales en cuanto a embriones transferidos y preñeces logradas, se describen en la Tabla 3.1. y en la Figura 3.1., se especifican en ellas la totalidad de embriones transferidos en los tres grupos experimentales. El número de embriones que resultaron en preñez y las tasas porcentuales de preñez, la mayor tasa correspondió al grupo hCG (40,7%), lo que representa una diferencia estadísticamente significativa ( $<0,05$ ).

Tabla 3.1. Tasa de preñez en los grupos experimentales

Grupo	Embriones Transferidos	Preñeces efectivas	%
Control	100	31	31,0
hCG	86	35	40,7
Polímero	100	20	20,0

Respecto a la tasa de preñez por biotipo, se observa una tasa referente al tipo indicus del 32% frente a una tasa del 27% hallada en el biotipo Bos Taurus.

Pese a existir una mayor tasa de preñez en el Biotipo Bos indicus, no se encontró una evidencia de significancia estadística al respecto  $P= 0.4040$ .

Con la finalidad de profundizar por Grupo con preñez positiva se procede a discriminar con la variable biotipo; donde es relativamente mayor el nivel de preñez en el tipo Índicus, corroborando la observación anterior. Sin embargo, al revisar por grupo es

posible determinar que no es consistente la discriminación, con las relaciones encontradas en el análisis de regresión presentado posteriormente.

Tabla 3.2. Distribución por grupo con preñez positiva

Grupo	Preñadas	Taurus	Indicus	% Preñez Taurus	% Preñez Índicus
<b>Control</b>	31	12	19	38,7	61,3
<b>hCG</b>	35	12	23	34,3	65,7
<b>Polímero</b>	20	8	12	40,0	60,0

Frente a la incidencia de la donadora de ovocitos en la tasa de preñez, se trabajaron 55 donantes de ovocitos, de las cuales 28 dieron preñeces repartidas en los tres grupos experimentales, todos los embriones transferidos fueron calidad uno y en grado de desarrollo entre blastocisto y blastocistos expandidos. El material genético de las donadoras y según la producción a transferir, formó parte de uno, dos o los tres grupos experimentales.

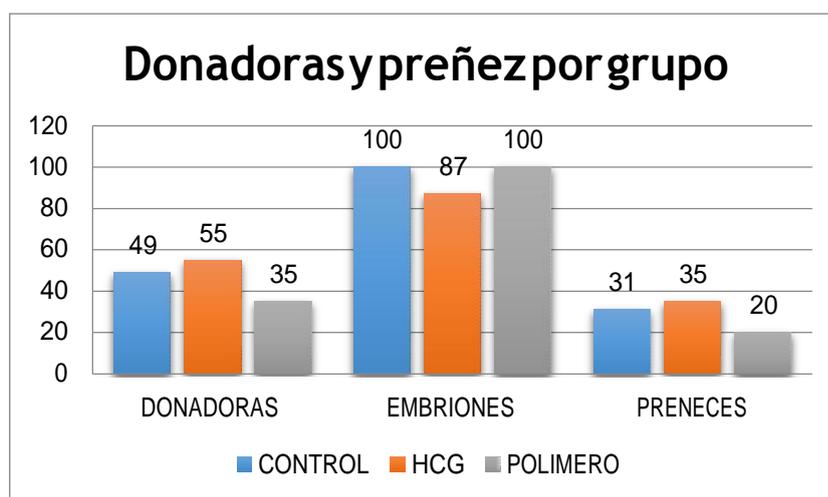


Figura 3.1. Donadoras y preñez por grupo

En relación con la incidencia del toro en las tasas de preñez, en los grupos Control y hCG se usaron 17 toros para el proceso de fertilización in vitro en la producción de embriones, de las razas Holstein, Gyr, Limousin, Jersey, Brahman, Ayrshire. Para el grupo Polímero se usaron 13 toros de las mismas razas. Se hicieron en total 286 transferencias para un total de 86 preñeces, para una tasa de preñez del 30%.

Tabla 3.3. Incidencia del toro

<b>TORO</b>	<b>TRANSF</b>	<b>% DE USO</b>	<b>PREÑECES</b>	<b>% PREÑECES</b>
<b>CALIVER</b>	36	12,59	8	22,2
<b>LION DIT</b>	7	2,45	2	28,6
<b>PLAINE</b>	3	1,05	1	33,3
<b>DECAF</b>	10	3,50	3	30,0
<b>RABO</b>	13	4,55	7	53,8
<b>VAIDOSO</b>	24	8,39	8	33,3
<b>AVALON</b>	16	5,59	2	12,5
<b>RIC RED</b>	18	6,29	5	27,8
<b>MOGUL</b>	26	9,09	8	30,8
<b>METEOR</b>	11	3,85	3	27,3
<b>DAMONA</b>	7	2,45	1	14,3
<b>0.56</b>	22	7,69	3	13,6
<b>MONTROSS</b>	59	20,63	19	32,2
<b>617-13</b>	5	1,75	3	60,0
<b>VISIONARY</b>	4	1,40	3	75,0
<b>PH UISQUE</b>	14	4,90	6	42,9
<b>FARDO</b>	11	3,85	4	36,4
	<b>286</b>		<b>86</b>	

En cuanto a la relación entre la ubicación geográfica y las tasas de preñez se transfirieron 286 embriones de los cuales 53 fueron transferidos en trópico alto y 233 en trópico bajo. En trópico alto se dieron 22 preñeces en 53 receptoras transferidas para una tasa de preñez del 41,50%. En el trópico bajo se dieron 64 preñeces en 233 receptoras transferidas para una tasa de preñez del 27,7%.

En el Grupo Control (100) las receptoras que fueron transferidas (n=100) procedían de los mismos 12 predios, de las preñeces obtenidas en este grupo (n=31) solo 4 correspondieron a receptoras ubicadas en trópico alto (> a 1800 msnm) y 27 en trópico bajo (< a 1800 msnm). En este grupo donde se obtuvieron 31 preñeces, 27 preñeces fueron en trópico bajo y 4 en trópico alto.

En el Grupo hCG las receptoras que recibieron los embriones (n=86) provenían de 12 predios ubicados en los departamentos de Caldas, Tolima y Quindío, 5 predios en trópico alto (> 1800 msnm) y los restantes 7 por debajo de esta medida (< 1800 msnm). En relación con las preñeces obtenidas (n=35) 24 se dieron en receptoras ubicadas en trópico bajo (<1800 msnm) y 11 en trópico alto (> 1800 msnm).

En el Grupo Polímero (100), las receptoras que recibieron los embriones (n=100) provenían de 12 predios ubicados en los departamentos de Caldas, Tolima y Quindío, 5 predios en trópico alto (> 1800 msnm) y los restantes 7 por debajo de esta medida (< 1800 msnm). En relación con las preñeces obtenidas (n=20) 13 se dieron en receptoras ubicadas en trópico bajo (<1800 msnm) y 7 en trópico alto (> 1800 msnm).

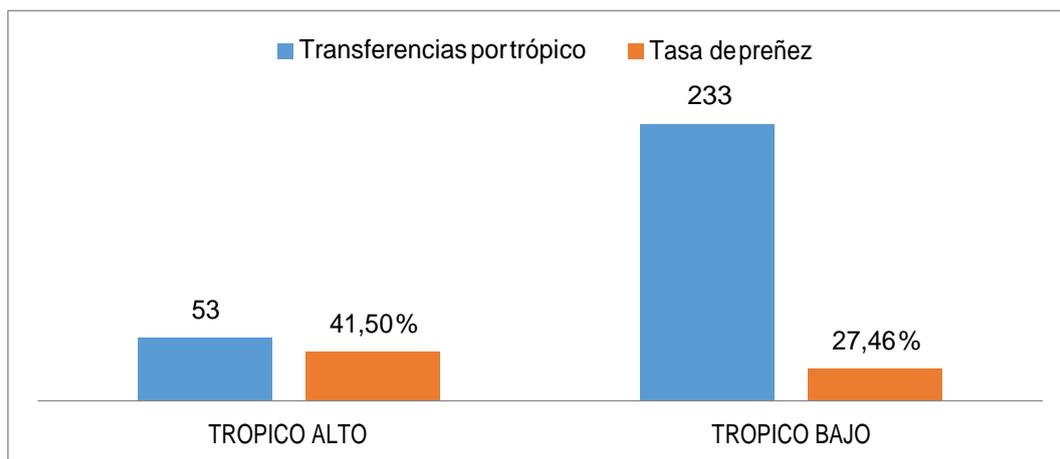


Figura 3.2. Tasa de preñez según la ubicación geográfica

En los tres grupos experimentales el 64% de las estructuras halladas en los ovarios correspondieron a CL3 el 36% restante estuvo representado por diversas estructuras que se relacionan en la Tabla 3,4.

Tabla 3.4. Estructuras halladas por grupo

<b>ESTRUCTURA</b>	<b>CONTROL</b>	<b>%</b>	<b>HCG</b>	<b>%</b>	<b>POLIMERO</b>	<b>%</b>	<b>TOTAL</b>	<b>%</b>
							<b>GENERAL</b>	<b>GENERAL</b>
<b>CL3OD</b>	35	35,0	35	40,7	32	32,0	102	35,7
<b>CL3OI</b>	36	36,0	22	25,6	23	23,0	81	28,3
<b>CL3OD + CAV</b>	2	2,0	7	8,1	5	5,0	14	4,9
<b>CL3OI + CAV</b>	6	6,0	2	2,3	3	3,0	11	3,8
<b>CL3OD + FOL</b>	1	1,0	3	3,5	4	4,0	8	2,8
<b>CL3OI + FOL</b>	1	1,0	5	5,8	3	3,0	9	3,1
<b>CL</b>	5	5,0	5	5,8	3	3,0	13	4,5
<b>ACCESORIOS</b>								
<b>CL2OD</b>	7	7,0	0	0,0	11	11,0	18	6,3
<b>CL2OI</b>	3	3,0	5	5,8	10	10,0	18	6,3
<b>CL2OD + CAV</b>	2	2,0	2	2,3	1	1,0	5	1,7
<b>CL2OI + CAV</b>	0	0,0	0	0,0	1	1,0	1	0,3
<b>CL2OD + FOL</b>	2	2,0	0	0,0	4	4,0	6	2,1
	100		86		100		286	

Se tuvieron disponibles 508 novillas receptoras que fueron sometidas al proceso de sincronización detallado en la sección Materiales y Métodos, 400 respondieron adecuadamente al tratamiento y a efectos del experimento fueron transferidas 286.

Se obtuvo una tasa de utilización de receptoras del 79%, con un dato mínimo del 45% y un máximo del 100%.

### Concentraciones de progesterona en sangre los días 0, 14 y 21

En las muestras de progesterona tomadas en sangre pueden notarse unos mayores niveles iniciales el día de la transferencia de los embriones, para los grupos Control y hCG frente al grupo Polímero, sin embargo, hacia el día 14 posterior a la transferencia de los embriones dicho grupo muestra un incremento importante mientras los otros grupos experimentales muestran niveles estables entre los días 14 y 21 posterior a la transferencia de los embriones. El grupo Polímero hacia el día 21 muestra incluso mayores niveles de P4.

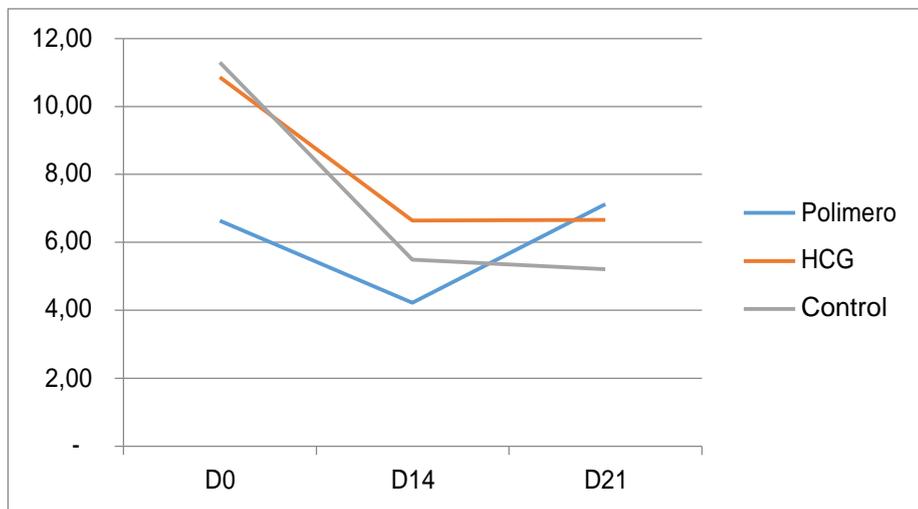


Figura 3.3. Niveles de p4 los días 0, 14 y 21

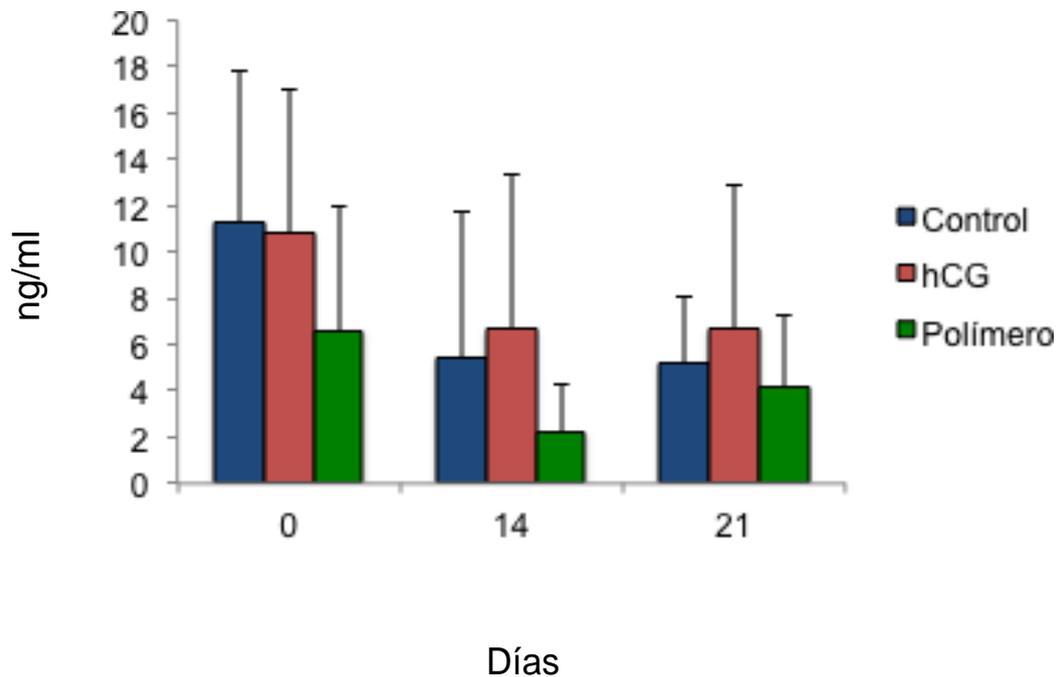


Figura 3.4. Efecto del grupo sobre los niveles de progesterona

Como se aprecia existen 4 datos por encima de 10 ng / ml en el día 0 para cada uno de los grupos de estudio, el resto de datos está por debajo de la línea de tendencia.

En el día 14 se dieron 4 datos por encima de 10 ng / ml en los grupos hCG (86) y Control (100), en el grupo Polímero (100) la medición de P4 estuvo por debajo de la línea de tendencia.

Para el día 21 en el grupo hCG (86) se dio una sola medición de P4 por encima de 20 ng/ ml, en los otros dos grupos (polímero y control) las mediciones estuvieron por debajo de la línea de tendencia.

A la observación, no se encuentra una relación entre los niveles de P4 y la preñez de las 5 receptoras en las que se tomaron muestras para determinar niveles de P4 y que luego de la transferencia resultaron preñadas; dado que sólo hay un animal en los grupos Control (100) y Polímero (100), no es viable realizar un análisis en términos estadísticos.

El efecto del grupo sobre los niveles de progesterona no fue significativo, aunque presentó una tendencia ( $p=0,1$ ). El día en que se tomaron las muestras afectó la concentración de progesterona ( $p=0,006$ ). La interacción no fue significativa, por lo que el efecto del grupo no varió de acuerdo a los días. Sin embargo, la concentración de P4 al día 14 para el grupo con polímero (100) tuvo un valor de  $p=0,12$  comparado con el grupo hCG.

En la presente observación se establece un nivel promedio de P4 en el grupo tratado con polímero relativamente menor que los grupos Control y hCG en el día de la transferencia. Para el día 14 el nivel promedio de P4 es persistentemente menor en el grupo tratado con Polímero.

El día 21 se presenta relativa estabilidad en los grupos Control y hCG mientras que el grupo tratado con polímero presenta un incremento en los promedios de P4, lo que hace suponer un buen nivel de P4 para el ciclo siguiente.

## **CAPÍTULO 4.**

### **DISCUSIÓN**

En el presente estudio se niega la hipótesis planteada pues la aplicación de progesterona intrauterina no mejoró las tasas de preñez en ninguno de los grupos experimentales, por el contrario, mediante la aplicación de hCG cuatro días antes de la transferencia de los embriones, se obtuvieron las mayores tasas de preñez.

Los efectos de la progesterona han sido rebatidos, ya que hay estudios que han demostrado que los mismos tienen un comportamiento distinto según el biotipo y el estado reproductivo (Rizos et al. 2010), poniendo de manifiesto la necesidad de que además del control de los niveles de progesterona, éstos se asocien a otras condiciones que tienen impacto en el mantenimiento de la preñez.

En un estudio realizado por (Oyuela & Jiménez, 2010) se administró progesterona inyectable (P4) en el momento del implante, con el fin de determinar sus efectos, los animales intervenidos no presentaron ninguna diferencia respecto de aquellos a los que no se les aplicó. Situación diferente, por ejemplo, de aquellos a los que se les aplicó eCG, que, en el citado estudio, presentaron un incremento estadístico en el número de CL. Sin embargo, es de aclarar, que ello no influyó en las tasas de preñez, llevándolos a concluir que el aumento en la concentración de progesterona no representa necesariamente un impacto positivo en las tasas de preñez.

Una situación similar se presentó con los resultados del estudio realizado por Barceló et al. (2009), en el que se evidenció que la producción de progesterona no representa un aumento mayor en las tasas de preñez. En el mencionado estudio se contrastaron los índices de preñez en receptoras que al momento de la transferencia tenían CL sólidos, en relación con aquellas que tenían CL cavitarios sin observar variaciones

significativas, sugiriendo con ello que el CL con cavidad podría presentar la misma producción de progesterona, sin que esto afecte las tasas de preñez.

En el presente estudio, se observó incluso, que la tasa de preñez en el grupo Polímero, correspondiente a aquel al que se le adicionó P4, resultó más baja que la del mismo grupo Control (20% vs 30%, respectivamente). En el caso de factores asociados al biotipo, los tratamientos con progesterona no son definitorios. En un estudio realizado por Álvarez et al. (2000), en el que se contrastaba la circulación de estradiol de vacas Brahman, Angus y Senepol, la comparación no evidenció diferencias en la máxima circulación de estradiol entre éstas, no obstante, se aclara que estas diferencias fueron solo de tipo numérico.

Por su parte, Segerson *et al.* (1984) no identificaron variaciones en la concentración de progesterona en los CL de vacas Brahman y Angus ( $75,8 \pm 11,3$  y  $65,9 \pm 5,3$   $\mu\text{g/g}$  de CL, respectivamente,  $P > 0,10$ ). No obstante, en otro estudio se identificó que las hembras Bos Taurus, presentaban mayores concentraciones de progesterona que hembras Bos indicus y Bos indicus mestizas (Randel, 1976).

La incidencia de la donadora de ovocitos sobre las tasas de preñez, también constituye un asunto multifactorial puesto que el número de ovocitos recuperables de una donadora se encuentra condicionado al número de folículos en el ovario y éstos a su vez, se asocian a la raza y a las condiciones climáticas y nutricionales (Figueiredo *et al.* 1997). Estudios como los de Silva-Santos et al. (2011) presentaron entre sus hallazgos que las vaquillas Bos Taurus e indicus, no muestran diferencias en relación con la población folicular que poseen, sin embargo, Quispe *et al.* (2015) encontraron que las razas Bos indicus presentan mayor número de ondas foliculares. En el estudio que se relaciona en el presente informe, la donadora de ovocitos no reportó influencia alguna sobre las tasas de preñez, de las 55 donadoras utilizadas, 28 generaron preñeces en los tres grupos que se trabajaron en el estudio (Control, hCG y P4).

En materia de la relación existente entre el toro usado y las tasas de preñez, no se hallaron diferencias significativas que puedan sugerir que el toro pueda tener una incidencia en las tasas de preñez. En el rastreo no se identificó bibliografía que sustente que haya una relación toro-tasa de preñez. Es de anotar que, en el presente estudio, cada toro no fue utilizado el número de veces suficiente como para identificar diferencias sustantivas que confirmen que el toro tenga influencia sobre las tasas de preñez.

El clima, como factor ambiental y extrínseco al que están expuestos los animales, ha demostrado influir en las tasas de preñez de bovinos transferidos. Estudios realizados por Franco *et al.* (2006) permitieron el hallazgo de diferencias estadísticamente significativas en programas de inseminación artificial en novillas de la raza Holstein en Florida (Estados Unidos), mostrando un mayor porcentaje en los meses de octubre, noviembre, febrero y marzo, 21,4% (40/187), frente a los meses de más calor en la zona que corresponden a mayo y septiembre, 13,5% (39/290).

No todos los estudios reportan resultados que coincidan con la diferenciación especificada en el estudio citado, Hasler (2001) reportó que no hay diferencias significativas estadísticamente en los porcentajes de preñez de bovinos transferidos en primavera (68,8%), verano (67,7%), otoño (67,8%) e invierno (68,5%). En el presente estudio, si bien se notó un mejor rendimiento en los animales de trópico alto que fueron transferidos (41,5%), frente a una tasa de preñez más baja (27,7%) en aquellos que viven en el trópico bajo, la diferencia no es la suficiente estadísticamente para aseverar que es un factor que influya en las tasas de preñez.

El CL juega un papel relevante en los procesos de transferencia de embriones, por la asociación de esta condición a la secreción de progesterona, cuya suficiencia es necesaria para el mantenimiento de la preñez. Por esta razón, en los procesos de transferencia de embriones, se han implementado técnicas orientadas a garantizar que se forme, a optimizar su tamaño o a que se generen varios. Binelli, (2001) realizó un estudio para elevar la tasa de concepción en animales transferidos utilizando hCG, GnRH o LH en

el día 7 luego del estro con el fin de formar CL accesorios o ejerciendo un efecto luteotrópico adicional propio de la hCG. Los resultados mostraron las siguientes concentraciones de progesterona (ng/ ml) el día 13: 4,79 (+/- 2,79), 8,42 (+/- 3,64), 6,07 (+/- 3,09) para GnRH, hCG y LH respectivamente, lo que llevó a concluir que al realizar la evaluación postsincronización, el tratamiento aplicado con hormonas elevó el número de receptoras aptas para ser transferidas respecto del grupo Control.

Otro estudio comparó cuatro protocolos de sincronización en novillas de las razas *Bos taurus* y *Bos indicus*, entre estos, la aplicación de P4 y de hCG. Dicho estudio no mostró diferencias entre los tratamientos con o sin progesterona, si bien evidenció una diferencia estadística en los grupos tratados con eCG en relación con la cantidad de CL, esta condición no varió las tasas de preñez pues no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos contrastados (Nasser et al., 2004).

Otros estudios como el realizado por Baruselli (2001) reportaron relaciones entre el CL hallado y las tasas de preñez. En el mencionado estudio, los CL de más de 2 cm de diámetro, generaron niveles de progesterona de alrededor de 2,44 ng/ml, que representaron a su vez, tasas de preñez del orden del 58,0%. Mientras que aquellas que tuvieron CL de menor tamaño (1,55 cm), produjeron a su vez, niveles de progesterona más bajos (1,75 ng/ml), y presentaron igualmente, una tasa de concepción más baja (41,0%); finalmente, aquellas que presentaron cuerpos lúteos menores a 1,5 cm de diámetro, tuvieron niveles de progesterona de alrededor a 1,19 ng/ml y una tasa de concepción del 31% ( $P < 0,05$ ).

En los tres grupos experimentales se evidenciaron niveles decrecientes de P4 hacia el día 14, sin embargo, el grupo Polímero mostró un incremento en dichos niveles entre los días 14 y el 21 en relación a los otros dos grupos experimentales. Lo anterior muestra una tendencia del grupo Polímero referida en una ascendente concentración de P4. Los niveles de P4 han evidenciado ser eficaces en la detección de celo, razón por la cual constituye un factor importante en el control reproductivo (Plasse et al. 1970). Un estudio realizado por Aguirre et al. (2006), relacionó la frecuencia de celo, la tasa de fertilidad y los niveles de

P4 al momento de la inseminación artificial en vacas Brahman, en el estudio los hallazgos no demostraron que existiera una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de P4 y las tasas de fertilidad (45%). En este sentido, la P4 resulta eficaz para efectos de control reproductivo, no resuelve por sí sola las tasas de fertilidad.

Se ha evidenciado en consecuencia, que tanto el proceso de implantación del embrión como el desarrollo del mismo, es una situación multifactorial en el que confluyen condiciones de orden exógeno y endógeno. No obstante esta situación, es claro que hay secreciones hormonales que luego de la fertilización, favorecen el desarrollo del embrión y el mantenimiento de la preñez. Entre estas hormonas, la progesterona tiene un lugar especial por sus efectos sobre el CL, además de estimular en el útero, funciones necesarias para el desarrollo embrionario en sus primeras fases, y genera cambios en el ambiente uterino necesarios para la sobrevivencia del embrión (Spencer et al. 2007; Lonergan, 2011; Bazer, 2013).

Hay estudios que han hallado correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de P4 durante el diestro, con la capacidad del embrión de secretar IFN- $\tau$ , y su consecuente impacto en el aumento de las tasas de preñez (Mann et al. 2006). En el presente estudio, no se halló una relación entre los niveles de P4 y la preñez de las receptoras a las que se les tomaron muestras para determinar los niveles de P4 y que luego de la transferencia resultaron preñadas. Es necesario tener en cuenta que sólo hay un animal en los grupos Control y Polímero, por lo que aplicarles un análisis estadístico resulta inviable.

En materia del efecto que tienen las receptoras en las tasas de preñez, los factores más importantes son aquellos asociados a las condiciones de crianza, estado nutricional y manejo sanitario, más que la raza o categoría (Cutini et al. 2000). Otro estudio ha demostrado que la procedencia de la receptora tiene un fuerte impacto en las tasas de preñez, si la receptora procede del mismo sitio, se habrá ahorrado el estrés derivado de la adaptación a un nuevo medio en relación con el clima, la alimentación, entre otros. Por lo que es más favorable que hayan sido criadas en el lugar, obteniendo desde un 10% hasta un

15% más de preñeces frente a animales incorporados de forma más reciente al rodeo (Alberio, 1993).

Aspectos como la raza de la receptora, también han sido evaluados en ocasiones sin encontrar diferencias entre receptoras de razas lecheras (46,0%), carniceras (43,2%) y doble propósito (43,9%); (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. 1997). Sin embargo, otros investigadores han encontrado que las razas cruzas tienen un mejor desempeño que las puras y que son preferibles las cruzas continentales por el hecho de ser más económicas y por su potencial lechero. Así mismo, plantean que los animales de origen lechero tienen mejor desempeño frente a los animales para carne con cría al pie. Argumentando docilidad y probablemente mayor fertilidad (Broadbent et al. 1991).

El estado nutricional de la receptora es un factor que influye de forma determinante en todo el proceso reproductivo, encontrando que el contenido energético brindado a la receptora, juega un papel crucial en los cambios producidos por la transferencia hasta el momento del parto y el parto-celo (Sreenan & Diskin, 1987).

En el caso del presente estudio, de las 508 novillas receptoras que fueron sometidas al proceso de sincronización, 400 respondieron adecuadamente al tratamiento, y de éstas, fueron transferidas 286 (100 grupo Control, 100 grupo Polímero y 86 del grupo hCG). Los resultados del presente estudio no indican que haya algún efecto del tipo de receptora en las tasas de preñez, es de notar que no se evaluaron de forma detallada aspectos relacionados con la procedencia, el número de veces que había sido usada la receptora, sólo se exigió que tuvieran el 70% del peso adulto y que estuvieran en buenas condiciones físicas y sanitarias.

En el presente trabajo la única variable que tuvo una diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) en relación con la tasa de preñez, fue el Grupo de tratamiento, para el caso específico del estudio, el grupo que recibió el tratamiento con hCG (40,7 % de

preñez), otro grupo fue tratado con polímero (20% de preñez), y se estableció una muestra de control adicional (30% de preñez). De otro lado, estudios como los de Hernández Cerón & Morales Roura (2001), plantean que los resultados de los tratamientos en que se induce un CL accesorio, son variables. En el estudio realizado por dichos autores no encontraron efectos en el tratamiento hCG utilizado posinseminación.

Para efectos de transferencia de embriones, se ha evidenciado que los tratamientos que combinan estradiol y dispositivos con P4, derivan en una sincronización de la nueva onda folicular efectiva y la hCG, administrada después de retirado el dispositivo, genera una adecuada sincronización de la ovulación que lleva a tasas de preñez aceptables. El mencionado protocolo produjo una tasa de receptoras transferidas de entre el 80 y el 85%, y tasas de preñez del 50%, además de que elimina la necesidad de detección de celos, (Bó et al. 2004). Veselinovic et al. (1990) evidenciaron en sus estudios, un aumento hasta del 14% de la tasa de preñez administrando 1500 UI de hCG después de la transferencia.

Por su parte, Ellington et al. (1992) utilizaron en sus estudios Buserelina, un análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), en la evaluación de los efectos de dicha hormona, no hallaron efectos luteotróficos de ésta, que mejoraran la tasa de preñez del grupo tratado frente a aquel que no recibió tratamiento.

En el caso del presente estudio, la aplicación de hCG se realizó 4 días antes de la transferencia, mientras que la administración de P4 en forma local se realizó al momento de la transferencia, sin embargo, estudios como los de Yan et al. (2016) evidenciaron por ejemplo que la suplementación con progesterona exógena era beneficiosa si se comenzaba entre el día 3 al 7 anterior a la transferencia de los embriones.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Frente al modelo de regresión logística se demuestra que la única variable que interviene en la tasa de preñez de manera causal y significativa es Grupo. Donde el conjunto de individuos tratados con hCG presentaron tasas de preñez superiores frente al grupo tratado con polímero, resultado que en la prueba de hipótesis fue contrastado de manera significativa.

El efecto probabilístico de la intervención con hCG genera un cambio en la razón de probabilidad de preñez de 1,505 con respecto al grupo control. Esto evidencia los efectos positivos y significativos del uso de dicha hormona frente a la tasa de preñez.

El efecto probabilístico de la intervención con Polímero genera un cambio en la razón de probabilidad de 0,521 con respecto al grupo control, reduciendo de manera significativa la probabilidad de preñez.

Desde el punto de vista analítico se logra demostrar que las variables de control (ubicación, estructura en el ovario, biotipo de receptora, toro usado en la fertilización, donadora de ovocitos), no determinan las tasas de preñez, permitiendo que el proceso sea replicable sin tener en cuenta estas variables.

A partir de los resultados se logra establecer que, en el proceso replicable de transferencia de embriones, el uso de la hCG incrementa de manera notable las tasas de preñez independientemente de las variables descritas.

Con respecto a la concentración de P4 en los diferentes grupos se observa una mayor concentración en el grupo intervenido con hCG frente al grupo intervenido con Polímero en el día 0. Para el día 14 se mantiene una diferencia relativa favoreciendo al grupo hCG. Para el día 21 hay un aumento relativo en el nivel de P4 para el grupo intervenido con polímero superior al nivel registrado por el grupo de hCG. Lo anterior puede ser una tendencia interesante, aunque no es concluyente dada la varianza presentada en los resultados y el tamaño de la muestra, no es procedente concluir al respecto. Estos hallazgos pueden ser susceptibles de contrastación aplicando una muestra mayor.

En general los resultados obtenidos con relación a las pruebas de P4 son interesantes, aunque presentan problemas relacionados con la varianza, condición que no permite concluir sobre los datos obtenidos y mucho menos generar inferencias. Más puede dar vía a una siguiente fase de investigación.

## CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, G., Pardo, C., & Góngora, A. (2006). Inicio del celo, tasa de gestación y relación del tiempo de inseminación con los niveles de progesterona en vacas Brahman. *Rev. MVZ Córdoba* 11 (1), 766-772.
- Alberio, R. (1993). Manejo de donantes y receptoras 1ra. Edición . En G. A. Palma, & G. Brem, *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina* (págs. 25-31). Buenos Aires, Argentina: Hemisferio sur .
- Albin , A., Gustafsson, H., Hurst , M., & Rodriguez-Martinez, H. (1991). Embryonic ability to prolong the interoestrous interval in virgin and repeat breeder heifers. *Anim Reprod Sci*, 193-210.
- Alvarez, P., Spicer, L., Chase, J., & Payton, M. (2000). Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science* 78, 1291-1302.
- Barceló, F. M., Brink, Z., & Seidel , G. (2009). Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. *Theriogenology* , 71: 355-368.
- Baruselli, P. (2001). Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. *Theriogenology* 55, 943 - 956.
- Baruselli, P., Ferreira, R., Filho, M., Nasser, L., Rodrigues, C., & Bo, G. (2010). Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *ReprodFertil Dev*, 22, 67-74.
- Bauersachs , S., Ulbrich, S., Zakhartchenko , V., Minten, M., Reichenbach, M., Reichenbach, H., . . . Wolf , E. (2009). The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos Minten M, Reichenbach M, Reichenbach HD, Blum H, Spencer TE, Wolf E. *Proc Natl AcadSci USA*, 5681-5686.

- Bazer, F. (2013). Contributions of an animal scientist to understanding the biology of the uterus and pregnancy . *Reprod. Ferti. Dev.* 25, 129 - 147.
- Binelli, M. T. (2001). Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56. *Theriogenology* 56, 1451 - 1463.
- Binelli, M., Thatcher, W., Mattosi, R., & Barusell, P. (2001). Antiluteolytic Strategies to Improve Fertility in Cattle. *Theriogenology* , 1451–1463.
- Bó, G., Cutaia, L., Souza, A., & Baruselli, E. (2009). Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche utilizando dispositivos con progesterona. *Taurus* 11, 20-34.
- Bó, G., Moreno, D., Cutaia, L., & Caccia, M. (2004 ). Transferencia de embriones a tiempo fijo: Tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus – Año 4, Nª 21*, 25-45.
- Bridges, P., Wright, D., Buford, W., Ahmad, N., McCormick, M., & Schrick, F. (2000). Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *Anim. Sci*, 2942–2949.
- Broadbent, P., Stewart, M., & Dolman, D. (1991). Recipient management and embryotransfer. *Theriogenology*, 35., 125-139.
- Burke, C., Macmillan, K., & Boland, M. (1996). Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. *Reproduction Science*. 45, 13-28.
- Carter F, F. N. (2008). Effect of increasing progesterone concentration from day 3 ofPregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *ReprodFertilDev*, 20, 368-375.
- Clemente, M., De La Fuente, J., Fair, T., Al Naib, A., Roche, J., Rizos, D., & Lonergan. (2009). Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, 507-517.
- Cutini, A., Teruel, M., & Cabodevila, J. (2000 ). Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Taurus Nª 8* , 35-47.

- De Rensis, F., Lopez-Gatiús, F., Garcia-Ispierto, I., & Techakumpu, M. (2010). Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: an update. *Theriogenology* 73, 1001–1008.
- Dogi, F. C. (2005). *Manejo farmacológico del ciclo estral del bovino*. Retrieved 2018 йил 14-agosto from Repositorio Digital de Acceso Abierto: [www.produccion-animal.com.ar/](http://www.produccion-animal.com.ar/)
- Ellington, J., Foote, R., Farrel, P., Hasler, J., Webb, J., Henderson, W., & McGrath, A. (1992). Pregnancy rates after use of gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*, 36, 1035-1042.
- Fair, T., Lonergan, P., & Boland, M. (2000-2001). The acquisition of developmental competence in bovine oocytes . *Animal Science and Production*, 30-35.
- Figueiredo, R. B. (1997). Ovarian follicular dynamics follicular dynamics in Nelore breed (Bos indicus) cattle. *Theriogenology* 47, 1489- 1505.
- Flores Jiménez, O. A., Roque Velázquez, C. I., Reyes López, O., Benítez Sánchez, S., Oropeza Almazán, M. A., & Hernández Cerón, J. (2013). Porcentaje de concepción en vacas lecheras tratadas con progesterona cinco días después de la inseminación. *Rev Mex Cienc Pecu*, 507-514.
- Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M., Evans, A., Spencer, T., . . . Roche, J. (2009). Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. . *BiolReprod* 81, 784 - 794.
- Franco, M., Thompson, P., Brad, A., & Hansen, p. (2006). Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone at Days 11, 14 or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. *Theriogenology* 66 (4), 945-54.
- Garrett, J., Geisert, R., Zavy, M., & Morgan, G. (1988). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. . Reprod. Fertil.* 84, 437 - 446.
- Ginther, O. J. (1970 ). Effect of progesterone on length of estrous cycle in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 31, 493–496.

- Gómez, L., Ruiz Cortés, Z., Olivera, M., & Giraldo, C. (2008). Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino. *Analecta veterinaria*, 42 - 47.
- Hafez , H., & Hafez , B. (2000). Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation. En W. Lippincott, & Wilkins, *Reproduction in Farm Animals*. . (págs. 68-81). Pennsylvania, EEUU.: Hafez ESE Hafez B (Eds.).
- Hasler, J. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56, 1401-1415.
- Hawk, H. (1983). Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *Journal of DairyScience*, v. 66, 2645–2660.
- Hernández Cerón, J., & Morales Roura, J. S. (2001). Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Veterinaria México*, 279 - 287.
- Hugentobler SA, S. J. (2010). Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *ReprodFertil Dev*, 22, 684 - 694.
- Inskip, E. (2004). Preovulatory , postovulatory , and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.* 82, 24–39.
- Kunkel, J. (2005). *Embryo transfer, dairy integrated reproductive management*. Vermont: University of Vermont.
- Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76, 1594-160.
- Lonergan, P., Hara, L., & Forde, N. (2013). Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. *Anim. Reprod.* 10, 223–227.
- Macmillan, K., Taufan , V., Day, A., & Peterson, A. (1991). Effects of supplemental progesterone on pregnancy rates in cattle. *Reprod Fertil*, 290 - 301.

- Maillo, V., Rizos, D., Besenfelderl, U., Havlicek , V., Kelly, A., Garrett , M., & Lonergan, P. (2012). Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. *Dairy Sc*, 3865-3876.
- Mann , G., & Lamming , G. (1999). The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dom Anim* , 269-274.
- Mann, G., Fray , M., & Lamming, G. (2006). Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet J* 171, 500–503.
- Mansouri, i.-A. N., Sandra, O., Aubert, J., Degrelle, S., Everts, R., Giraud, D. C., . . . JP, R. (2009). Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies Everts RE, Giraud-Delville C, Heyman Y, Galio L, Hue I, Yang X, Tian XC, Lewin HA, Renard JP. . *Proc Natl AcadSci USA*, 5687 - 5692.
- Mapletoft, J., & Hasler, F. (2005). Assisted reproductive technologies in cattle: A review. *Rev Sci tech off Int*, 393-403.
- Martínez Gamboa, R., Hernández, J. I., Méndez Palacios, N., Vázquez Flores, F., Huerta Crispín, R., Rodríguez Castillo, J. d., & Méndez Mendoza, M. (2013). *Utilización de la gonadotropina coriónica humana (HCG) en vacas receptoras de embriones en ganado de doble propósito en el trópico seco del estado de Morelos (México)*. Retrieved 2018 йил 14-Abril from Segundo Congreso Internacional en Ciencias Veterinarias y Zootecnia:  
<https://www.uv.mx/veracruz/cienciaanimal/files/2013/11/Tercer-Foro-Internacional-Biologico-Agropecuario-Memorias-extenso.pdf#page=48>
- Morales Roura, J., Hernández Cerón, J., & Vázquez García, J. (1998). Efecto del tratamiento con hCG al momento de la inseminación artificial sobre la función del cuerpo lúteo y fertilidad de vacas Holstein repetidoras. *Vet. Mex*, 269 - 272.
- Murphy, B. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod*, 223-230.
- Nascimento, A., Bender, R., Souza, A., Ayres, H., Araujo, R., Guenther, J., . . . Wiltbank, M. (2013). Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after

- timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 96, 2873-2882.
- Nasser, L., Reis, E., Oliveira, M., Bo GA, & Baruselli, P. (2004; 62 (9)). Comparison of four synchronization protocols for fixed time embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos Taurus* recipients. *Theriogenology*, 1577- 1984.
- Okuda, K., Miyamoto, Y., & Skarzynski, D. (2002). Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 255–64.
- Oyuela, L. A., & Jiménez, C. F. (2010). Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones . *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, vol. 57, núm. III, septiembre-diciembre, 191-200 .
- Palma, G. (2001). Biotecnología de la reproducción. Ediciones Inta Balcarce.
- Perez Wallace, S. (2013). *Tratamientos hormonales para reducir pérdidas de gestación en vacas lecheras. Tesis Doctoral*. Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
- Plasse, D., Warnick, A., & Koger, M. (1970). Reproductive behaviour of *Bos indicus* females in a subtropical environment. IV. Length of estrus cycle, duration of estrus, time of ovulation, fertilization and embryo survival in grade Brahman heifers. *J Anim Sci* , 30:63.
- Pope, W., Cardenas, H., Wiley, T., & McClure, K. (1995). Dose–response relationships of exogenous progesterone shortly after ovulation on estrous cycle length, blastocyst development and fertility in sheep. . *Anim. Reprod. Sci.* 38, 109–117.
- Rajamahendran, R., & Sianangama, P. (1992). Effect of human chorionic gonadotropin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *J Reprod Fertil*, 95577-584.
- Rajamahendran, R., & Sianangama, P. (2009). Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *Journal of Reproduction and Fertility*. In *SAS: user guide: Statics* (pp. 577-584). Cary, NC: Edition “SAS institute Inc”.

- Randel, R. (1976). LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. *Journal of Animal Science* 43, 300.
- Restrepo Betancur, G. (2007). *Biotechnologías aplicables a la producción bovina en Colombia*. Medellín: Libro arte litografía y publicidad.
- Rizos, D., Carter, F., Besenfelder, U., Havlicek, V., & Lonergan, P. (2010). Contribution of the female reproductive tract to low fertility in postpartum lactating dairy cows. *J DairySci*, 93, 1022-1029.
- Rizos, D., Scully, S., Kelly, A., Ealy, A., Moros, R., Duffy, P., . . . Lonergan, P. (2012). Effects of human chorionic gonadotrophin administration on Day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 472–481.
- Roberts, R., & Bazer, F. (1988). The functions of uterine secretions. *Reprod Fertil*, 875-892.
- Robinson, N., Leslie, K., & Walton, J. (1989). Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *Dairy Sci*, 202-207.
- Ryan, D., Kopel, E., Boland, M., & Godke, R. (1991). Pregnancy rates in dairy cows following the administration of GnRH analogue at the time of artificial insemination or at mid-cycle post insemination. *Theriogenology*, 367 - 377.
- Satterfield, M., Bazer, F., & Spencer, T. (2006). Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *BiolReprod*, 75, 289-296.
- Segerson, E., Hansen, T., Libby, D., Randel, R., & Getz, W. (1984). Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *Journal of Animal Science*, 59, 1026-1046.
- Spencer, T., Johnson, G., Bazer, F., Burghar, R., & Palmarini, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 65 - 78.

- Sreenan, J., & Diskin, M. (1987). Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in cow. *Theriogenology*, 27, 99-113.
- Stevenson, J., Portaluppi, M., Tenhouse, D., Lloyd, A., Eborn, D., Kacuba, S., & DeJarnette, J. (2007). Interventions after artific insemination: Conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to Gonadotropin-releasing Hormone, human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. *Dairy Sci*, 331-340.
- Thatcher, W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T., & Pru, J. (2001). Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56, 1435–1450.
- Tovío L, N., Arturo Duica, M., & Henry, A. M. (2008). Desarrollo embrionario y estrategias antiluteolíticas hormonales en programas de transplante de embriones bovinos. *Revista MVZ Córdoba Volumen 13(1) Enero-Abril*, 1240 - 1251.
- Van Cleeff, J., Drost, M., & Thatcher, W. (1996). Effects of postinsemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrous responses of dairy heifers. *Theriogenology*;36:, 795-807.
- Van Wagendonk-de Leeuw, A., Den Daas, J., & Rall, W. (1997 ). Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, 48, 1071-1084.
- Veselinovic, S., Popovski, K., Kosarcic, D., Veselinovic, S., Rajcann Separovic, E., Mocrovic, G., & Medic, D. (7 y 8 de Septiembre de 1990). The importance of preparation of recipients and the quality of embryos for a successful embryo transfer in cattle. *6o Réunion A.E.T.E.-Lyon*.
- Vivanco, W. (2002). Mejoramiento genético bovino a través de tecnologías reproductivas de avanzada, III seminario internacional, competitividad en leche y carne. *Medellín*, 227-247.
- Wiltbank, M., Souza, A., Carvalho, P., Bender, B., & Nascimento, A. (2013). Cómo mejorar la fertilidad a la IATF mediante la manipulación de las concentraciones de progesterona circulante en el ganado lechero. 10° Simposio Internacional de

Reproducción Animal. *10° Simposio Internacional de Reproducción Animal*, (págs. 77-90). Córdoba, Argentina.

Yan, L., Robinson, R., Shi, Z., & Mann, G. (2016). Eficacia de la suplementación con progesterona durante el embarazo temprano en las vacas: un metanálisis. *Teriogenologia*, 1390-1398.

## CRONOGRAMA

Año	Mes/Procesos	Evaluación y sincronización	FIV	Transferencia de embriones	Diagnóstico temprano
2016	Julio				
	Agosto				
	Septiembre				
	Octubre				
	Noviembre				
	Diciembre				
2017	Enero				
	Febrero				
	Marzo				
	Abril				
	Mayo				
	Junio				
	Julio				
	Agosto				
	Septiembre				
	Octubre				
	Noviembre				
	Diciembre				
2018	Enero				
	Febrero				
	Marzo				
	Abril				
	Mayo				
	Junio				
	Julio				

	Agosto				
--	--------	--	--	--	--

## COSTOS DEL PROYECTO

**Tabla 1. OPU – Transferencia y maquila**

<b>CONSUMIBLES</b>	<b>Cantidad</b>	<b>V/ Unitario</b>	<b>V/ Total</b>
<b>Fundas de Transferencia</b>	72	\$18.000	\$1.296.000
<b>Xilocaina</b>	60	\$4.500	\$270.000
<b>Materiales Laboratorio</b>	27	\$55.000	\$1.485.000
<b>Campo</b>			
<b>Materiales de OPU</b>	27	\$100.000	\$2.700.000
<b>Envíos Ovocitos y</b>	54	\$32.000	\$1.728.000
<b>Embriones</b>			
<b>MAQUILA DE</b>	359	\$60.000	\$21.540.000
<b>EMBRIONES</b>			
<b>GRAN TOTAL</b>			<b>\$29.019.000</b>

**Tabla 2. Valor de los equipos**

<b>CONSUMIBLES</b>	<b>Cantidad</b>	<b>V/ Unitario</b>	<b>V/ Total</b>
<b>Ecografos</b>	2	\$14.000.000	\$28.000.000
<b>Bombas de Aspiración</b>	2	\$6.000.000	\$12.000.000
<b>Guías de Aspiración</b>	2	\$6.500.000	\$13.000.000
<b>Estéreos</b>	2	\$2.000.000	\$4.000.000
<b>Baño María</b>	2	\$2.200.000	\$4.400.000
<b>Transportadora Ovocitos</b>	2	\$6.500.000	\$13.000.000
<b>Transportadora Embriones</b>	1	\$6.800.000	\$6.800.000
<b>Pipetas</b>	2	\$350.000	\$700.000

<b>GRAN TOTAL</b>	<b>\$81.900.000</b>
-------------------	---------------------

Fuente: construcción propia

**Tabla 2. Valor procedimientos**

<b>Sincronización</b>	<b>Aspiración</b>	<b>Transferencia</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Reconfirmación</b>	<b>Desplazamiento</b>
<b>\$11.390.000</b>	\$19.200.000	\$12.840.000	\$11.140.000	\$11.140.000	\$10.803.500

Fuente: construcción propia

