

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA
MAESTRÍA EN GANADERÍA ANDINA



TESIS

**EFFECTO DEL CUERPO LÚTEO ACCESORIO EN LA VIABILIDAD
EMBRIONARIA POR TRANSFERENCIA EN VACUNOS**

PRESENTADA POR:

DYONI CALDERÓN MAMANI

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAGISTER SCIENTIAE EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

PUNO, PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA
MAESTRÍA EN GANADERÍA ANDINA



TESIS
EFECTO DEL CUERPO LÚTEO ACCESORIO EN LA VIABILIDAD
EMBRIONARIA POR TRANSFERENCIA EN VACUNOS

PRESENTADA POR

DYONI CALDERÓN MAMANI

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAGISTER SCIENTIAE EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

PRESIDENTE


.....
DR. LUIS VICENTE OLIVERA MAROCHO

PRIMER MIEMBRO


.....
M.Sc. ROLANDO DANIEL ROJAS ESPINOZA

SEGUNDO MIEMBRO


.....
M.Sc. HUGO WENCESLAO DEZA CALSIN

ASESOR DE TESIS


.....
Mg. JESÚS MARTÍN URVIOLA SÁNCHEZ

Puno, 22 de setiembre del 2016.

ÁREA: Reproducción animal.

TEMA: Efecto del cuerpo lúteo accesorio en la viabilidad embrionaria por transferencia en vacunos.

LÍNEA: Biotecnología reproductiva.

DEDICATORIA

- A mi Madre, quien siempre me protegió, animó, insistió y me vigiló sin condiciones en todos los momentos; símbolo de compromiso, esfuerzo y perseverancia a quien debo mi formación. Su memoria me sirve de inspiración en mi vida cotidiana.
- A mi esposa Nelly, mis hijos Emily y Alejandro. Gracias por transformar mi vida y fijarme objetivos profesionales.
- A mis hermanos Eloy, Dimas, Gladys, Nelson, Ruth y Wilbert. Su apoyo incondicional ha sido vital en mi formación como profesional.
- Al Ing. Hugo Sacachipana Yucra, quien representa a todos los ganaderos productores de leche de la Región y quién fue el pionero de la ganadería lechera en Taraco y en cuya granja nació mi pasión por la ganadería y sus Biotecnologías reproductivas.

AGRADECIMIENTOS

- Mi reconocimiento y agradecimiento a la Escuela de Post Grado UNA – Puno, a sus Maestros de la Maestría en Ganadería Andina Especialidad Reproducción Animal, sus aportes han mejorado mi desempeño laboral.
- Al Mg. Martín Urviola Sanchez, su acompañamiento, aportes y amistad han sido vitales en la ejecución de la presente Tesis.
- A los miembros del Jurado: Dr. Luis Olivera Marocho, Mg. Sc. Rolando Daniel Rojas Espinoza, Mg. Sc. Hugo Wenceslao Deza Calsín. Su conocimiento, tiempo y paciencia en la Revisión del trabajo ha sido muy importante.
- Al Centro de Investigación en Transferencia de embriones, en especial a la Ing. Giselle Gamarra Lazo y la Ing. Amalia Gallegos Cárdenas.
- Al Instituto de Reproducción Animal de la Facultad de Zootecnia UNA –La Molina en la persona del Ing. Edwin Mellisho Salas.
- A los productores de Mañazo en especial al Ing. Guido Ortega Achata propietario del Fundo Santa Inés.
- A la Comunidad Campesina Vizcachani en la persona del Sr. Gregorio Sánchez.
- A la Sra. Judy Castañeda por su preocupación y valioso apoyo

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I**PROBLEMÁTICA DE LA INVESTIGACIÓN**

1.1	Planteamiento del problema	2
1.2	Objetivos	4
1.2.1	Objetivo general	4
1.2.2	Objetivos específicos	4

CAPÍTULO II**MARCO TEÓRICO**

2.1	TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (ET)	5
2.1.1	Importancia de la transferencia de embriones	5
2.2	CUERPO LÚTEO	6
2.2.1	Estructura y función	6
2.2.2	Desarrollo y regresión fisiológica del cuerpo lúteo	8

2.3	FUNCIÓN E IMPORTANCIA DE LA P4	9
2.4	MUERTE EMBRIONARIA	10
2.5	FORMACIÓN DE CUERPO LÚTEO ACCESORIO	11
2.6	GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA	13
2.7	HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS	14
2.8	DINÁMICA FOLICULAR	15
2.9	SELECCIÓN DE HEMBRAS DONANTES EN PROGRAMAS DE T.E.	16
2.10	SELECCIÓN DE RECEPTORAS EN PROGRAMAS DE T.E.	17
2.11	OVULACIÓN MULTIPLE	17
2.12	COLECTA DE EMBRIONES	18
2.13	CLASIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS	20
2.14	CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS	21
2.15	COMUNICACIÓN EMBRIOMATERNA	22
2.16	INTERFERÓN TAU	24

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1	ÁMBITO DE ESTUDIO	25
3.2	MATERIAL EXPERIMENTAL	26
3.2.1	Donadoras	26
	A.- Manejo de donadoras	27
3.2.2	Embriones	28
3.2.3	Receptoras	31
3.2.4	Distribución de vaquillas receptoras	32
3.2.5	Hormonas aplicadas para formación de cuerpo lúteo	
	Accesorio	32
	a.- GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropinas)	32
	b.- hCG (Gonadotropina Coriónica Humana)	33

3.3	PROCEDIMIENTO PARA LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	33
3.3.1	Detección de celo	33
3.3.2	Transferencia de embriones	33
3.3.3	Diagnóstico de cuerpo lúteo accesorio y preñez	34
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	EFICIENCIA REPRODUCTIVA	36
4.1.1	Porcentaje de preñez	37
4.1.2	Presencia de cuerpo lúteo accesorio palpable	39
	CONCLUSIONES	43
	RECOMENDACIONES	44
	BIBLIOGRAFÍA	45
	ANEXOS	53

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Proporción de insumos para alimento balanceado	28
2. Protocolo de superovulación	28
3. Protocolo de congelamiento de embriones	29
4. Estructuras colectadas vaca NUTA	30
5. Estructuras colectadas vaca KIAI	31
6. Estructuras colectadas vaca ROSA	31
7. Distribución de receptoras para aplicación de hormonas	32
8. Esquema estadístico de FISHER	35
9. Índices reproductivos logrados	36
10. Porcentaje de preñez por transferencia de embriones en receptoras con aplicación de GnRH	37
11. Porcentaje de preñez por transferencia de embriones en receptoras con aplicación de hCG	38
12. Cuerpo lúteo accesorio en receptoras con aplicación de GnRH	39
13. Cuerpo lúteo accesorio en receptoras con aplicación de hCG	40
14. Grupo de receptoras para la aplicación de GnRH	54
15. Grupo de receptoras para la aplicación de hCG	55
16. Transferencia de embriones (Hormona GnRH)	56
17. Transferencia de embriones (Hormona hCG)	57
18. Diagnóstico de cuerpo lúteo accesorio y preñez con aplicación de GnRH	58
19. Diagnóstico de cuerpo lúteo accesorio y preñez con aplicación de hCG	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Intervalo interovulatorio de dos ondas	16
2. Intervalo interovulatorio de tres ondas	16
3. Esquema de colecta de embriones	19
4. Estadío de embriones según el día de desarrollo	21
5. R.G. de Huampaní Dominate Emory NUTA	26
6. R.G. de Huampaní Collect Pete KIAI	27
7. R.G. de San Isidro Payoff Dominate ROSA ET	27

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Selección de receptoras utilizadas en el estudio	54
2. Detalles de la transferencia de embriones	56
3. Muestras fotográficas de cuerpo lúteo accesorio	59
4. Fotografías de embriones producidos	60
5. Fotografías de algunas crías nacidas por transferencia de Embriones	61
6. Fotografías de donadoras utilizadas	62
7. Hormonas utilizadas en receptoras	63
8. Análisis estadístico: Prueba de probabilidad exacta de Fisher	67

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar el efecto del uso de la hCG y la GnRH sobre la formación de cuerpo lúteo accesorio y el efecto del cuerpo lúteo accesorio sobre la tasa de preñez en la transferencia de embriones, se estudiaron 28 animales distribuidos en 2 grupos de 14 vaquillas cada uno. El primer grupo recibió una dosis de 20 mcg. De GnRH el día 6 post celo (7 receptoras) y el día 7 post celo (7 receptoras). El segundo grupo recibió la dosis de 1000 UI de hCG el día 6 post celo (7 receptoras) y el día 7 post celo (7 receptoras). Se transfirió a todas las receptoras un embrión descongelado 7 días después de su celo natural. La presencia de cuerpo lúteo y preñez se realizó mediante palpación de ovarios vía rectal corroborado con ecografía. Se encontró cuerpo lúteo accesorio en el 42.9% de receptoras que recibieron GnRH y 71.4% en receptoras que recibieron hCG el día 6 post celo, además 85.7% de receptoras que recibieron hCG 7 días post celo presentaron cuerpo lúteo accesorio. El porcentaje de preñez fue 28.6% en las receptoras que recibieron GnRH el día 6 y 42.9% de preñez con aplicación de GnRH el día 7 post celo. Con respecto al uso de hCG se obtuvo 28.6% de preñez indistintamente del día de aplicación. Se observó que el uso de hCG para la formación de cuerpo lúteo accesorio es mejor que la GnRH, sin embargo; no se ve reflejado en el porcentaje de preñez siendo de mayor utilidad la aplicación de GnRH el día 7 simultáneamente a la transferencia de embrión. No hubo diferencia estadística significativa entre los grupos de receptoras que recibieron GnRH ni entre los grupos de receptoras que recibieron hCG con respecto al porcentaje de preñez y la presencia de cuerpo lúteo accesorio.

Palabras clave: Cuerpo lúteo accesorio, donantes, embriones, GnRH, hCG y receptoras.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of the use of hCG and GnRH on the formation of accessory corpus luteum and the effect of the accessory corpus luteum on the pregnancy rate in embryo transfer, 28 animals distributed in 2 groups of 14 were studied. heifers each. The first group received a dose of 20 mcg. GnRH on day 6 post-heat (7 recipients) and day 7 post-heat (7 recipients). The second group received the 1000 IU dose of hCG on day 6 post-estrus (7 recipients) and on the 7th post-estrus day (7 recipients). A thawed embryo was transferred to all recipients 7 days after its natural estrus. The presence of corpus luteum and pregnancy was performed by palpation of ovaries rectally corroborated with ultrasound. An accessory corpus luteum was found in 42.9% of recipients who received GnRH and 71.4% in recipients who received hCG on day 6 post-estrus, in addition 85.7% of recipients who received hCG 7 days post-estrus presented accessory corpus luteum. The pregnancy rate was 28.6% in the recipients who received GnRH on day 6 and 42.9% in pregnancy with GnRH application on day 7 post-heat. Regarding the use of hCG, 28.6% of pregnancies were indistinctly obtained on the day of application. It was observed that the use of hCG for accessory corpus luteum formation is better than GnRH, however; it is not reflected in the percentage of pregnancy, with the application of GnRH being more useful on day 7 simultaneously with the embryo transfer. There was no significant statistical difference between the groups of recipients who received GnRH nor between the groups of recipients who received hCG with respect to the percentage of pregnancy and the presence of accessory corpus luteum.

Keywords: Accessory corpus luteum, donors, embryos, GnRH, hCG and receptors

INTRODUCCIÓN

Con el propósito de incrementar la producción de carne y leche en la crianza de vacunos se ha implementado programas de mejora genética basados principalmente en el uso de la Inseminación artificial, sin embargo; los promedios en producción lechera de vacunos al 2013 en el Departamento de Puno proyectado por la mesa de concertación de lácteos estima un promedio de 4.5 litros/día/vaca el cual hace imposible desarrollar una crianza de vacunos rentable. Estas consideraciones han permitido que Instituciones, profesionales y productores incursionen en el desarrollo de la Transferencia de embriones como alternativa para el logro de animales con mejores promedios de producción principalmente de leche.

En el Departamento de Puno, existe pocos reportes de trabajos realizados en diferentes Provincias y Distritos, en todos ellos el porcentaje de preñez con embriones descongelados no supera el 40% creando incertidumbre en el productor. Se atribuye que una causa no infecciosa de la baja tasa de preñez por transferencia de embriones sería la pérdida embrionaria debido a una insuficiencia luteal, que se define como un cuerpo lúteo con una vida media corta o irregular, o una con una duración normal, pero con una producción de progesterona baja. En la vaca, la forma más común de insuficiencia luteal es un cuerpo lúteo con vida corta, pero producción normal de progesterona. La causa no se conoce bien, pero parece estar relacionada con una liberación prematura de Prostaglandina F_{2α} (Kastelic y Mapletoft, 2003).

En el presente estudio, se utiliza la GnRH y la hCG con el propósito de inducir la formación de un cuerpo lúteo accesorio en vaquillas receptoras de embriones y se evalúa su efecto sobre el porcentaje de preñez.

CAPÍTULO I

PROBLEMÁTICA DE INVESTIGACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La transferencia de embriones ha pasado a ser, tras 20 años de aplicación práctica, un instrumento fiable en la cría de animales en los últimos tiempos. La transferencia de embriones, junto con otras biotecnologías a ella asociadas (Conservación de embriones, fertilización in Vitro, tipificación genética y transferencia génica) ha alcanzado una posición clave como tecnología básica en la reproducción y producción animal (Gorlach, 1997).

Varios trabajos experimentales muestran la factibilidad de la aplicación de la transferencia de embriones en vacunos como una de las técnicas a ser usada en un programa de mejoramiento genético acelerado en condiciones del Altiplano Puneño, sin embargo; los bajos resultados experimentales en preñez y natalidad limitan actualmente su uso masivo. Análisis de varios trabajos sugieren que parte de la baja preñez sería resultado de una baja concentración de progesterona circulante el día de la transferencia conduciendo a una muerte embrionaria temprana. La etiología de la muerte embrionaria es diversa, sin

embargo, se puede dividir en factores genéticos y ambientales, dentro de estos últimos se encuentran las disfunciones endocrinas, estrés calórico, alteraciones en el ambiente uterino y endometritis (Thatcher *et al.*, 1994).

Las disfunciones del cuerpo lúteo han sido las más discutidas como causa de pérdidas embrionarias. Se pueden encontrar dos tipos de alteraciones en la función lútea: la primera consiste en un acortamiento de la vida media del cuerpo lúteo, y en la segunda se observa una producción subnormal de progesterona. Investigaciones diversas han concluido que una baja fertilidad es provocada por una deficiencia en la función lútea (Thatcher y Santos, 2001).

Con la finalidad de incrementar los niveles de progesterona circulante se han estudiado diferentes metodologías incluyéndose la aplicación de progesterona exógena y tratamientos conducentes a la formación de cuerpo lúteo accesorio 5, 6 y 7 días después de la inseminación artificial, con resultados diversos. La formación de un cuerpo lúteo accesorio se puede lograr mediante la aplicación de GnRH o hCG 5, 6 o 7 días después de la presentación de celo en receptoras.

Estas informaciones plantean la hipótesis que la formación de un cuerpo lúteo accesorio en la fase de diestro en receptoras incrementa los niveles de progesterona circulante y por consiguiente mejora los porcentajes de preñez por transferencia de embriones.

1.2 Objetivos

1.2.1 General

Evaluar el efecto de la formación de un cuerpo lúteo accesorio inducido con hCG o GnRH sobre el porcentaje de preñez por transferencia de embriones en receptoras.

1.2.2 Específicos

- Evaluar el efecto del uso de la hCG y la GnRH sobre la formación de cuerpo lúteo accesorio.
- Evaluar el efecto del cuerpo lúteo accesorio sobre la tasa de preñez en la transferencia de embriones.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (TE)

La Transferencia de embriones es una técnica de reproducción asistida que básicamente consiste en la deposición de un embrión (en sus primeros estadios de desarrollo) recuperado del tracto genital de una hembra (donadora) en el de otra (receptora) para su posterior gestación y parto. Desde el punto de vista metodológico la TE es sencilla en su concepto; pero, compleja en cuanto a su realización, debido principalmente al gran número de factores que inciden sobre ella y la necesidad de una serie de pasos precisos y consecutivos, de cada uno de los cuales dependerá el éxito o fracaso final de la técnica (CIETE, 2002).

2.1.1 IMPORTANCIA DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

Mediante los índices de ganancia genética en la producción de leche calculados en porcentaje por año, es posible la evaluación del impacto de la tecnología de producción y transferencia de embriones bovinos. Con las pruebas de progenie a través de un sistema eficiente, la ganancia genética varía de 1,5 a 2,0 % por año. Sin embargo, con un sistema de ovulación

múltiple y transferencia de embriones (TE) en hembras seleccionadas, estos índices varían entre 1,8 y 2,4 % el cual a su vez se mejora aún más cuando las vaquillas seleccionadas para la ovulación múltiple son animales de pedigree, en este caso el índice genético varía entre 2,6 y 3,5 %. A medida que se avanza con la tecnología los índices se mejoran considerablemente, por ejemplo, cuando se utiliza la tecnología de división de embriones en dos partes, el índice sube a 4% y finalmente cuando se utiliza la tecnología de clones este índice aumenta de 20 a 25 % (De Bem *et al.*, 1994).

2.2 CUERPO LÚTEO (CL)

2.2.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El cuerpo lúteo es una glándula temporal que se desarrolla a partir del folículo ovulatorio, proceso conocido como luteinización. Este proceso consiste en todos los cambios morfológicos, endocrinos y enzimáticos que ocurren en el folículo preovulatorio hasta que este se transforma en un cuerpo lúteo funcional (Smith, 1994). La luteinización comienza antes de la ovulación en respuesta a la elevación preovulatoria de las gonadotropinas (LH y FSH), siendo la LH la hormona más importante para la ruptura del folículo y su posterior transformación en una estructura lútea (Niswender y Nett, 1994).

La ovulación ocurre en promedio 30 horas después del pico preovulatorio de LH. Esta hormona provoca cambios en las paredes del folículo, que conducen a su ruptura (Karsch *et al.*, 1992). Después de la ovulación, el espacio ocupado previamente por el folículo es invadido por fibroblastos, células endoteliales, células de la teca interna y células de la granulosa. Las células esteroideogénicas del cuerpo lúteo han sido clasificadas de acuerdo

a su tamaño en células chicas y células grandes (Wiltbank y Niswender, 1992). El origen de estas células se ha estudiado mediante métodos morfológicos e inmunológicos; de esta forma, se conoce que durante la luteinización las células de la teca interna y de la granulosa migran y se distribuyen en el espacio que previamente fue ocupado por el folículo ovulatorio. Las células de la teca interna se multiplican y diferencian en células lúteas chicas, las cuales aumentan en número, pero no en tamaño. Estas células constituyen aproximadamente el 20 % del volumen del CL y representan el 25 % de las células. En contraste, las células de la granulosa se hipertrofian pero no se multiplican, por lo que dan origen a un número de células lúteas grandes que coincide con el número de las células de la granulosa presentes originalmente. Las células grandes llegan a representar el 40 % del volumen del CL y el 0 % del total de células (Farin 1986, Hansel 1991, Wiltbank y Niswender, 1992).

Bioquímicamente se observa que después del pico de LH la producción de androstenediona y 17 Beta estradiol disminuyen, y en contraste comienza a incrementarse la síntesis de progesterona (Alila y Dowd, 1991). Así, en el día 4 ó 5 después de la ovulación las concentraciones de progesterona en sangre son mayores de 1 ng/ml, lo que indica que el CL ha adquirido su plena funcionalidad. A partir de ese momento, y hasta el día 14 del ciclo en la oveja, o del día 18 en la cabra y vaca, el cuerpo lúteo secretará progesterona (Arvizu *et al.*, 1995, Hansey y Convey 1983, Quirke *et al.*, 1979). La progesterona es el principal producto de secreción del cuerpo lúteo.

2.2.2 DESARROLLO Y REGRESIÓN FISIOLÓGICA DEL CUERPO LÚTEO

Después de la ovulación, el cuerpo lúteo se diferencia por completo hasta convertirse en una glándula endocrina típica que secreta P4. La hormona esteroide secretada por el cuerpo lúteo cumple varias funciones: a) prepara al endometrio para la implantación; b) capacita al blastocisto para implantarse, y c) mantiene la preñez después de la implantación. La vida útil del cuerpo lúteo que varía entre especies, depende principalmente del curso de la formación del embrión. Después de la implantación del blastocisto, el cuerpo lúteo experimenta un gran crecimiento y continúa sintetizando y secretando hormonas esteroides. (Hafez, 1987).

La LH es responsable de la formación y mantención del cuerpo lúteo (Docke, 1981). Después del aumento preovulatorio de la concentración de LH en la sangre periférica, una relativamente baja secreción basal posibilita el desarrollo morfológico y funcional del cuerpo lúteo, donde se presentan diferentes mecanismos de acción (Docke, 1980).

Las células luteínicas menores o células luteínicas pequeñas poseen receptores para LH que secretan apenas bajas cantidades de P4 en ausencia del estímulo de la LH. Las células luteínicas mayores a su vez, presentan muy pocos receptores para LH, sin embargo; producen gran cantidad de P4 independiente del estímulo hormonal (Fitz *et al.*, 1982).

Las células luteínicas mayores poseen entre tanto, receptores para prostaglandinas de tal forma que la secreción de esteroides y la vitalidad de estas células están determinadas por la PGF2 α . La PGF2 α también actúa

sobre las células luteínicas menores, posiblemente disminuyendo el estímulo de LH. Se supone que este efecto ocurre vía células mayores, ya que las células menores no poseen receptores para $PGF2\alpha$ (Silva *et al.*, 1984). Un efecto vasoconstrictor así como un bloqueo en la síntesis de progesterona (P4) (Berhman *et al.*, 1971) después de la acción de la prostaglandina, también son discutidos.

La $PGF2\alpha$ se forma en el útero y se transporta hasta el ovario vía sanguínea (Bairdy y Land, 1973) o por difusión entre la vía uterina y la arteria ovárica (Hafez, 1987). Después de la luteólisis la secreción de progesterona termina y las células luteínicas se degeneran. La evolución completa se presenta por la infiltración de fibroblastos, que forman un tejido de cicatrización (corpus albicans) (Baker, 1976).

2.3 FUNCIÓN E IMPORTANCIA DE LA PROGESTERONA (P4)

La progesterona regula los cambios que deben ocurrir en oviducto y útero para que el embrión se desarrolle; esta hormona regula las secreciones uterinas, de las cuales los embriones recibirán los nutrientes y sustancias que estimularán su crecimiento y diferenciación (Roberts y Hazer, 1988). Esta hormona actúa básicamente sobre los órganos genitales de la hembra, siendo responsable de la preparación del útero para el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Alila y Dowd, 1991). En la mucosa del oviducto y del útero, la progesterona estimula la secreción de sustancias que nutrirán al embrión hasta que este comience a hacerlo a través de la placenta. Además, la progesterona evita las contracciones del útero, cierra el cérvix y modifica las características del moco cervical, volviéndolo más viscoso, lo que evita el paso de agentes extraños al interior del útero. Por otra parte, la progesterona estimula el desarrollo del

sistema alveolar de la glándula mamaria, preparándola para la síntesis y secreción de leche (Niswender y Nett, 1994).

2.4 MUERTE EMBRIONARIA

En ovejas y en vacas se ha encontrado que altas concentraciones de progesterona estimulan el desarrollo embrionario (Kerbler *et al.*, 1997, Pope *et al.*, 1995). Las anomalías en la función lútea se han asociado con la muerte embrionaria temprana, así, se ha observado que las vacas con baja fertilidad (subfértil) tienen una función lútea anormal durante los primeros 7 días posteriores a la inseminación (Kimura *et al.*, 1987, Shelton *et al.*, 1990). Esta anomalía también es común en vacas en lactación que se encuentran en balance negativo de energía durante las siguientes 6 semanas posparto (Villa-Godoy *et al.*, 1998). En estos animales se obtienen bajos porcentajes de concepción, los que se asocian con esa disfunción lútea. El estrés calórico ocasiona alteraciones en la función del cuerpo lúteo; se ha observado que las vacas sujetas a estrés calórico producen menos progesterona que las vacas que se encuentran en temperatura de confort (Rosemberg *et al.*, 1997). La asociación de la función lútea con la falla en la concepción no solo depende del efecto que pudiera tener la progesterona sobre el desarrollo embrionario sino que se asocia con la falla en el reconocimiento materno de la gestación, de tal forma que una vaca que tiene buena función del cuerpo lúteo mantiene una relación progesterona-estradiol dentro de cierto rango, que hace menos susceptible el mecanismo de inicio de secreción de PGF_{2a}, mientras que otra vaca con una fase lútea subnormal no logra una relación adecuada entre estas dos hormonas, por lo cual el inicio de la secreción de la PGF_{2a} es más sensible (Lamming y Mann, 1995). Bajo estas circunstancias, el establecimiento y mantenimiento de

la gestación en las vacas con fases lúteas subnormales se encuentra doblemente en desventaja, ya que por un lado al haber menos progesterona el desarrollo del embrión será más lento y tendrá menor capacidad para producir interferón trofoblástico bovino (bINT-t) (Kerbler *et al.*, 1997), Y por otra parte, los mecanismos que inician la secreción pulsátil de PGF2a son más sensibles debido a la relación anormal entre progesterona y estradiol (Lamming y Mann, 1995). (Thatcher *et al.*, 1989) señalan que un decremento en la actividad folicular durante la gestación temprana podría favorecer el mantenimiento del cuerpo lúteo. (Pritchard *et al.*, 1994) encontraron en vacas productoras de carne que el porcentaje de concepción a primer servicio disminuyó significativamente cuando las concentraciones de estradiol aumentaron en el día 14 a 17 del ciclo.

2.5 FORMACIÓN DE CUERPO LÚTEO ACCESORIO

Es posible la inducción de una segunda ovulación posterior al celo natural en vacas mediante el uso de hormonas que realizan este proceso, tales como la GnRH y hCG; como resultado se tiene la formación de un cuerpo lúteo accesorio. (Gatica, 2006).

Se trabajó en programas de Inseminación artificial induciendo la formación de cuerpo lúteo accesorio aplicando hCG al 5° día post IA; la mayor parte del incremento en la progesterona plasmática luego de la aplicación de hCG se debió a ese cuerpo lúteo accesorio. El tamaño del cuerpo lúteo, la producción *in vitro* de progesterona y las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron más grandes con los cuerpos lúteos accesorios inducidos por hCG que en los inducidos por GnRH. Debido a la inducción de ovulación al 5° día, esas vacas van a experimentar un ciclo de tres ondas foliculares, debido a una más temprana emergencia de la segunda onda (Thatcher y Santos, 2001). Además,

la tercera onda folicular será retardada. El desarrollo del embrión está relacionado con concentraciones más altas de progesterona y con la habilidad del mismo para generar Interferón tau (IFN- t). Por ende, la inducción de un cuerpo lúteo accesorio por medio de hCG, con el consecuente incremento de progesterona mejorará la sobrevivencia embrionaria. Se diseñó un estudio para determinar los efectos de la hCG (3,300 UI de Chorulon, intramuscular, Intervet Inc., Millsboro, DE) administrada 5 días después de la inseminación, sobre la formación de cuerpo lúteo accesorio, concentración de progesterona en plasma, tasa de concepción y pérdida de gestación en vacas Holstein de alta producción. Después de la sincronización del celo (GnRH seguido 7 días después por Prostaglandina F2alfa) y de la inseminación a celo detectado, 406 vacas Holstein de alta producción (43.0 +- 0.45 Kg. de leche/ día al tiempo de la IA) se inyectaron ya fuese con hCG o con solución salina, al 5º día después de la inseminación (203 por tratamiento) (Thatcher y Santos, 2001).

El tratamiento con hCG al 5º día del ciclo indujo la formación de uno o más cuerpos lúteos accesorios en el 86.2% de las vacas tratadas comparado con el 23.2% de las vacas control. El cuerpo lúteo accesorio incrementó la concentración plasmática de progesterona en vacas tratadas con hCG más no en los controles. El tratamiento con hCG incrementó ($P < 0.01$) las tasas de concepción al día 28 (45.8 vs. 38.7%), al día 45 (40.4 vs. 36.3%) y al día 90 (38.4 vs. 31.9%) después de la inseminación. Este estudio apoya el concepto de que mayores cantidades de progesterona durante la fase luteal, aumentan la sobrevivencia embrionaria (Thatcher y Santos, 2001).

Con el propósito de inducir una ovulación en el diestro, se inyectó 8 vacas con hCG y 8 vacas con GnRH el día 7 del ciclo. A los 3 días los animales fueron

sacrificados encontrándose cuerpo lúteo accesorio en todas las vacas tratadas con hCG, en tanto que en 7 de las 8 vacas tratadas con GnRH también se encontró cuerpo lúteo accesorio (Gatica, 2006).

2.6 GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA

La estructura química de la hCG ha sido bien definida como una glucoproteína que consta de subunidades α y β , con un peso molecular de 40 000 daltons. La subunidad α cuenta con 92 aminoácidos y dos cadenas hidrocarbonadas. Esta subunidad es similar a la unidad α de la LH de seres humanos, cerdos, ovinos y bovinos. La subunidad β tiene 145 aminoácidos y cinco cadenas hidrocarbonadas. La gonadotropina coriónica humana se sintetiza a partir de las células del citotrofoblasto de la placenta de primates preñados, y se la encuentra tanto en la sangre como en la orina. Se ha descubierto en la orina, a los ocho días de la concepción mediante métodos sensibles de radioinmunoensayo, esto es; solamente un día después de la implantación en el ser humano. La gonadotropina coriónica humana tiene acciones tanto de LH como de FSH, pero predominan las de LH. Es capaz de convertir el cuerpo lúteo del ciclo menstrual en el ser humano en cuerpo lúteo de la preñez.

La acción de LH de la hCG la ha convertido en la primera hormona disponible para tratar quistes ováricos en el ganado lechero. El tratamiento con hCG en una vaca con quistes ováricos requiere por lo general de 5000 a 10000 UI de hCG después de lo cual, los folículos ovulan y forman un cuerpo lúteo o, lo que sucede más a menudo, se luteinizan. En cualquier caso, las estructuras lúteas producen progesterona y el cuerpo lúteo continúa ejerciendo sus funciones por 20 días, cuando involuciona normalmente y permite que la vaca cumpla un ciclo

aproximadamente a los 21 días después del tratamiento, tiempo en el cuál se espera que el animal tenga el mismo éxito de concepción que una vaca sin quistes (Hafez, 1997).

2.7 HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS

La teoría del control hormonal de la hipófisis anterior, fue formulada en 1974 con base en los datos fisiológicos y anatómicos de que los nervios hipotalámicos liberaban sustancias hormonales al sistema portal hipotálamo – hipofisiario. Treinta años después, se determinó las estructuras químicas de las hormonas del hipotálamo que controlaban la función hipofisiaria. Las sustancias del hipotálamo que controlan la liberación de las hormonas hipofisiarias fueron inicialmente denominadas factores de liberación.

La hormona liberadora de gonadotropinas es undecapéptido con peso molecular de 1183 daltons. Esta hormona induce la liberación tanto de la hormona LH como de la FSH a partir de la hipófisis. La síntesis de un gran número de análogos estructurales de la GnRH, ha tenido gran importancia en el establecimiento de las relaciones de estructura y actividad de esta hormona. Se han sintetizado dos tipos básicos de análogos de GnRH. Los análogos antagonistas parecen unirse a un sitio receptor en la hipófisis, pero no induce la liberación de LH o FSH y bloquean la acción de la hormona natural. Los análogos estimuladores se han sintetizado e inducen la liberación de LH y FSH, al igual que la GnRH natural.

La liberación de LH como de FSH es controlada por la GnRH. La GnRH es eficaz para disolver los quistes foliculares en la vaca. En este caso, 100 μ g. de GnRH inducen la liberación de cantidades sustanciales de LH endógena que, a su vez, inducen luteinización o ruptura de los folículos quísticos. Una vaca con ovarios

quísticos tratados presentará esto en 19 a 23 días después y luego de le puede cruzar (Hafez, 1997).

2.8 DINÁMICA FOLICULAR

Estudios recientes utilizaron ecografía transrectal para analizar los estadios finales del crecimiento folicular en bovinos. En la Fig. 1 y 2 se muestra un esquema del crecimiento folicular y la FSH en una vaca con 2 ondas foliculares y otra con 3 ondas foliculares durante un ciclo estral de 21 días. Alrededor del momento de la ovulación se empieza a desarrollar un grupo de folículos pequeños en los ovarios. Dicho crecimiento se conoce como onda folicular. De este grupo de folículos se selecciona un folículo dominante que continúa creciendo mientras regresa el resto de los folículos de la onda folicular. Debido a la presencia de un cuerpo lúteo funcional y altas concentraciones de progesterona este primer folículo dominante no produce un pico de LH, comportamiento de celo ni sigue hasta la ovulación. El primer folículo dominante pasa a no ser funcional y comienza una nueva onda folicular a la mitad del ciclo. Una vez más se selecciona un folículo dominante de esta segunda onda folicular y este folículo continúa hasta ovular porque este folículo dominante es funcional al momento de la regresión del cuerpo lúteo. Algunas vacas tienen 3 ondas de crecimiento folicular con lo cual el segundo folículo dominante regresa, se inicia una tercera onda folicular y el tercer folículo dominante es funcional al momento de la luteólisis y es por lo tanto el folículo ovulatorio (IRAC, 2003).

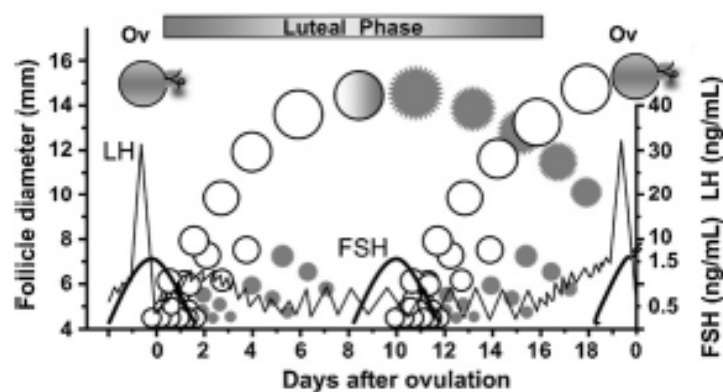


Figura 1. Intervalo interovulatorio de 2 ondas
Fuente: (Adams *et al.*, 2008)

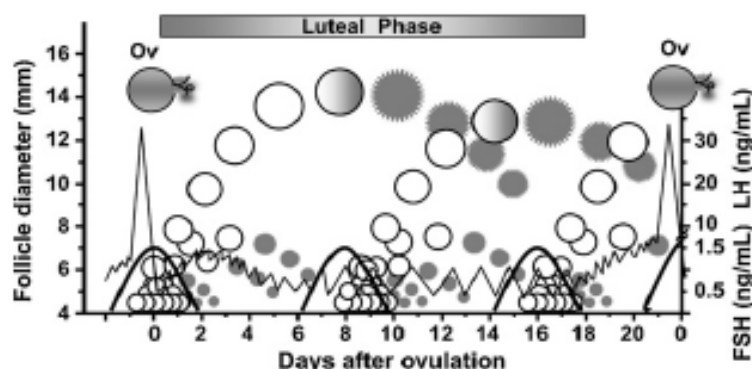


Figura 2. Intervalo interovulatorio de 3 ondas
Fuente: (Adams *et al.*, 2008)

2.9 SELECCIÓN DE HEMBRAS DONANTES EN PROGRAMAS DE T.E.

Años atrás, la transferencia de embriones solamente ha sido económicamente factible en ganado muy valioso, pero con los recientes avances (técnicas no quirúrgicas de recuperación y transferencia y mejores tasas de preñez de embriones congelados) los costos han sido significativamente reducidos, Frecuentemente, el 10 al 20% de un grupo élite de raza pura puede ser económicamente usada como donadora (CIETE, 2002).

La Selección de donadoras debería ser basada bajo tres criterios: Superioridad genética, habilidad reproductiva y valor de mercadeo de la progenie. Las novillas pueden ser valiosas como donantes de embriones pero el número de embriones transferibles es bajo, la propagación de hembras infértiles no es recomendable, a medida que la edad avanza (después de 10 años), el índice de fertilización del óvulo declina, en donantes tanto la obesidad como la condición de enflaquecimiento pueden reducir la fertilidad, las donantes pueden ser vacunadas al menos contra IBR, DVB, parainfluenza III, enfermedades causadas por clostridios y en algunas áreas leptospirosis (Elsden y Seidel, 1986).

2.10 SELECCIÓN DE RECEPTORAS EN PROGRAMAS DE T.E.

Selección de receptoras sanas y saludables, y completamente hábiles para la reproducción es el primer paso y el más importante. La receptora ideal es la hembra unípara (que ha tenido un parto) que ha destetado exitosamente sus propias crías y que es aún joven y capaz de gestar normalmente, parir sin ayuda y criar sus crías exitosamente (CIETE, 2002).

La selección de recipientes se deberá realizar teniendo en cuenta condiciones de calidad, flexibilidad económica y disponibilidad, la raza parece no tener una consideración significativa, aunque los animales cruzados generalmente son más fértiles. Las vacas viejas no deberán utilizarse por su decreciente habilidad de mantener la preñez. Animales salvajes son indeseables por las condiciones de manejo (Elsden y Seidel, 1986).

2.11 OVULACIÓN MÚLTIPLE

La ovulación múltiple consiste en la estimulación hormonal de la donante para la formación y desarrollo de varios folículos y su ovulación en ambos ovarios en

un momento previamente fijado (Gorlach, 1997). La superovulación es el aumento del número fisiológico de ovulaciones propio de la especie, provocado mediante la administración de gonadotrofinas. En el bovino, se considera que hubo respuesta al tratamiento cuando se producen más de dos ovulaciones. La superovulación, en un programa de transferencia de embriones, debe complementarse con un régimen óptimo de inseminación artificial, utilizando semen de muy buena calidad.

En 1984 se demostró que la respuesta superovulatoria resulta muy variable. En un estudio retrospectivo que incluyó 1263 donantes, el autor encontró que solamente el 68% de las hembras inducidas a superovular produjeron embriones transferibles. El 32% restante lo integraron:

- 7% sin estimulación ovárica
- 7% sin recolección de ovocitos ni embriones
- 17% sin embriones transferibles
- 1% donde no se efectuó el lavaje porque presentaron celo antes de administrársele la prostaglandina F_{2α} durante el tratamiento hormonal. (Palma, 2008).

2.12 COLECTA DE EMBRIONES

En el inicio, en 1973 coleccionar embriones de una vaca se hacía bajo anestesia general e involucraba un gran equipo y un trabajo muy fatigoso. Más tarde en 1975 se desarrollaron un método semiquirúrgico, a través, del techo de la vagina con un aparato llamado "Patacult". Finalmente se desarrolló la colecta Trans – cervical también llamada no quirúrgica. En la actualidad la sonda más usada,

copiada del modelo Foley, es la sonda alemana en dos tamaños, N° 15 para vaquillonas y N° 18 para vacas (De Bem *et al.*, 1994). La sonda o catéter flexible alemán es modelo Neustadt/Aisch con balón hinchable, que se introduce con un mandril o fijador para hacerla rígida, a través de la vagina, cervix y cuerpo uterino hasta uno de los cuernos (Gorlach, 1997).

La colecta propiamente dicha Fig. N° 3 consiste en pasar artificialmente el líquido a través del útero con PBS (Phosphate – Buffered Saline) a una temperatura de alrededor de 25 °C, pH 7.2 y osmoralidad de 290 miliosmol. La sonda de la colecta pasa por el cuello uterino y se fija en uno de los cuernos por un globo de aire. El líquido es introducido por gravedad en volúmenes de 50 a 150 ml, dependiendo del tamaño del útero, completando un volumen total de 500 a 1000 ml. La recuperación del líquido también se efectúa por gravedad. La utilización de un filtro facilita y agiliza la obtención de los embriones (De Bem *et al.*, 1994).



Figura 3. Esquema de colecta de embriones
Fuente: (Adaptado de Elsdén y Seidel, 1986)

2.13 CLASIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS

Las técnicas de producción, colecta, transferencia y conservación de embriones han evolucionado en los últimos años. Sin embargo la evaluación morfológica de los embriones a través del examen en microscopio estereoscópico con aumento entre 10 a 100 veces, es aún bastante subjetiva.

En esta evaluación morfológica la clasificación embrionaria establece patrones morfológicos que juzgan la forma, pero no la vida embrionaria. Solamente la práctica y el contacto diario con los embriones, son los que dan al técnico el criterio de la real calidad del embrión (De Bem *et al.*, 1994).

La clasificación propuesta por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) toma en cuenta:

- Estadío del embrión, de acuerdo a la edad del embrión al momento de la colección.
- Morfología del embrión, sin anormalidades o irregularidades.

A).- Embriones Transferibles:

- GRADO A ó grado 1.- Excelentes o buenos
- GRADO B ó grado 2.- Regulares
- GRADO C ó grado 3.- Pobres

B).- Embriones no transferibles:

- GRADO D ó grado 4.- Embriones degenerados o muertos
- GRADO E ó grado 5.- Ovocitos no fertilizados

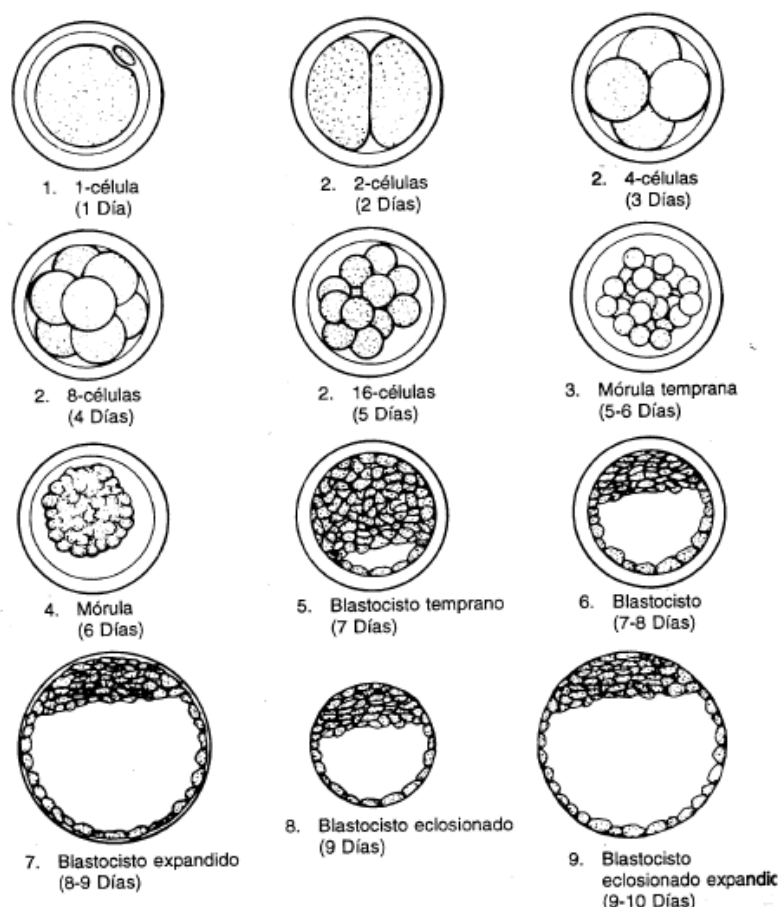


Figura 4. Estadío de embriones según día de desarrollo
Fuente: (Adaptado de Elsdén y Seidel, 1986)

2.14 CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS.

La criopreservación posibilita almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que se pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos. Si bien los embriones son un conjunto de células, se aplican principios criobiológicos originalmente estudiados en células aisladas tales como linfocitos y fibroblastos (Palma, 2008).

Las técnicas de criopreservación permiten conservar embriones por distintos períodos dependiendo de las temperaturas que se utilicen. La refrigeración es

un método simple por medio del cual pueden mantenerse embriones a temperaturas entre 0° y 4°C durante 24 a 72 horas. La conservación a -196 °C permite mantener embriones por períodos extensos. En 1989 se identificó cuatro etapas comunes a las diferentes técnicas: exposición de los embriones a concentraciones molares de agentes crioprotectores, enfriamiento desde temperaturas fisiológicas hasta temperaturas lo suficientemente bajas como para causar un virtual cese de todas las reacciones químicas inducidas térmicamente, calentamiento desde la temperaturas de conservación a temperaturas fisiológicas y finalmente, extracción del crioprotector. En la *congelación convencional*, ampliamente difundida, los embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura y lo mantienen durante el enfriamiento. Este, se lleva a cabo lentamente permitiéndole a los embriones contraerse y ceder agua, en respuesta al incremento gradual de la concentración de la solución extracelular. Se han desarrollado otras técnicas en las que se efectúa una deshidratación parcial de los embriones sin que estos alcancen su equilibrio osmótico, ellas son la *vitrificación* y la *congelación ultrarápida*. En la primera, dicha deshidratación ocurre antes del enfriamiento rápido y en la segunda, durante un breve período intermedio de exposición de los embriones a temperaturas debajo de 0 °C (Palma, 2008).

2.15 COMUNICACIÓN EMBRIOMATERNA

Contrariamente a lo que ocurre en roedores y humanos, la implantación en los animales domésticos sigue a un extenso período pre – receptivo de 8 – 15 días. Tanto las moléculas histótroficas de la madre (proteínas, carbohidratos, azúcares, lípidos, iones y productos de la secreción del embrión, contribuyen a su desarrollo dentro del lumen endometrial. Muchos de esos productos, como

las proteínas de transporte, proteasas, inhibidores de proteasas, citoquinas, linfoquinas y moléculas que participan en la adhesión, ejercen una influencia mutua entre el embrión y el endometrio uterino, de lo que se define como comunicación embriomaternal para que:

- Desarrolle el embrión, produzca y libere sus señales que permiten la continuidad del cuerpo lúteo durante ese período (reconocimiento de la gestación) y,
- Contribuya a crear un ambiente uterino compatible con la receptividad de la adhesión y fusión endometrial (implantación).

La implantación comienza con la aposición del blastocisto a la mucosa del útero y poco después el blastocisto se adhiere fuertemente a la pared y el trofoblasto transmigra a través del epitelio luminal del útero. La adhesión del blastocisto a la pared uterina es el primer paso para la implantación y posterior placentación. Para que eso tenga lugar deben cumplirse 2 requisitos críticos: La adecuada sincronización del desarrollo del endometrio y el embrión y la eficaz comunicación entre el embrión y las células endometriales. Este período se define como “ventana de implantación”. En la especie bovina el 40% de las pérdidas embrionarias ocurre durante los días 8 y 17 de la gestación e indica que la mortalidad embrionaria temprana es una razón muy importante en la disminución de la eficacia reproductiva en la producción de leche y carne. El diálogo molecular implica interacciones célula – célula y célula con la matriz extracelular, mediado por una amplia variedad de moléculas de adhesión, factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, proteínas moduladoras, enzimas, prostaglandinas, ciclooxigenasas, metaloproteinasas, radicales libres, etc.. Las moléculas reconocidas en el trofoblasto son, además del IFN τ el

lactógeno placentario (PL, placentallactogen), la proteína de leche uterina (uterin milk protein) y metaloproteinasas de la matriz (matrixmetaloproteinasas, MMP). Su adecuada expresión o inhibición contribuirá a la óptima receptividad para la implantación. La falla en mantener la gestación es considerada como la consecuencia de la insuficiente comunicación entre el embrión y las células del endometrio (Palma, 2008).

2.16 INTERFERÓN TAU

En la vaca, oveja y cabra, el IFN τ fue bien caracterizado como una señal embrionaria para inhibir la secreción de PGF2 α en los días 13 a 15 en la oveja y 15 a 21 en la vaca con la producción máxima los días 14 a 16. IFN τ es segregado por las células trofoblásticas mononucleares (trofoectodermo primitivo) del blastocisto. Su producción está en relación directa con la elongación y el tamaño de las vesículas trofoblásticas y disminuye con el comienzo de la placentación. Durante ese ajustado tiempo de expresión, el IFN τ interactúa con receptores de tipo IFN de las células epiteliales para modificar la producción de prostaglandinas y prevenir la luteólisis.

El IFN τ induce el mantenimiento de la gestación a través de varios mecanismos, la inadecuada o insuficiente reacción a su estímulo es causa de muerte embrionaria temprana y pérdida de la gestación. Por ello se consideró que el nivel de secreción de IFN τ puede ser un parámetro para establecer el grado de calidad del embrión y que la suplementación con IFN τ puede incrementar la viabilidad de los embriones in vivo. Induce la expresión de los genes de estimulación del interferón (ISGs) (Palma, 2008).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en un lote de 28 vaquillas Brown swiss de productores del Distrito de Mañazo, Provincia de Puno, Departamento de Puno, a una altitud de 3926 m.s.n.m. con las coordenadas Latitud Sur 15° 47' 54'' y longitud oeste 70° 20' 28'' pertenece a la zona agroecológica Suni. Limita por el Este con el Distrito de Vilque, por el Oeste con el Distrito de Ichuña Provincia General Sanchez Cerro Departamento de Moquegua, por el Norte con los Distritos de Cabana y Cabanilla Provincia de San Román y al Sur con el Distrito San Antonio de Esquilache. Se caracteriza por tener un clima seco y frío con una temperatura promedio anual de 12°C y una precipitación pluvial de 650 mm/año (Senamhi, 2009). La ejecución comprendió desde Enero del 2014 hasta Abril del 2016.

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1 DONADORAS. - Las donadoras utilizadas para la producción de embriones fueron:

- a. 02 vacas de Raza Brown Swiss con Registro adquiridas del establo Huampani– Chaclacayo – Lima el año 2007, adaptadas a condiciones del Distrito de Mañazo, cuyos embriones fueron congelados y almacenados en tanques criogénicos desde el año 2007.
- b. 01 vaca Brown Swiss con Registro nacida por transferencia de embriones en el año 2008 en el Distrito de Mañazo, Provincia y Departamento de Puno cuyos embriones fueron congelados y almacenados.



Figura 5. Donante: Huampani Dominate Emory NUTA

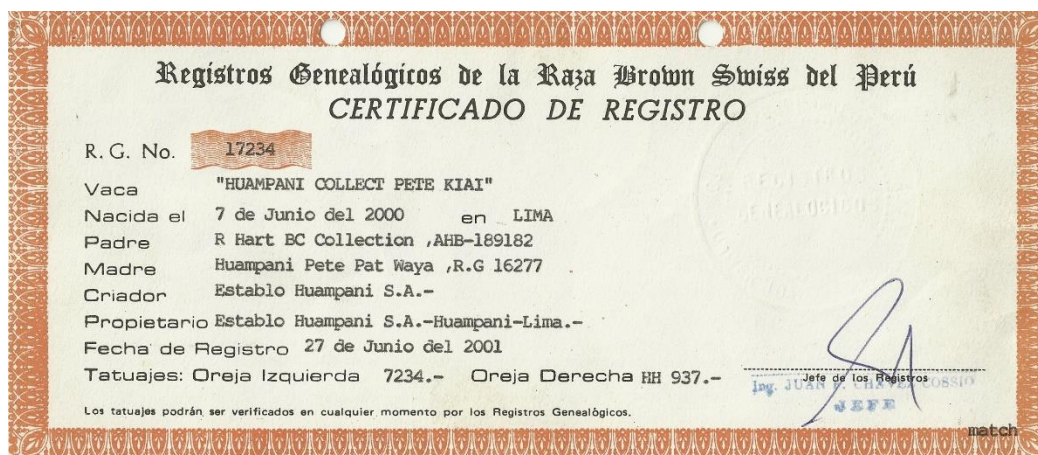


Figura 6. Huampaní Collect Pete KIAI

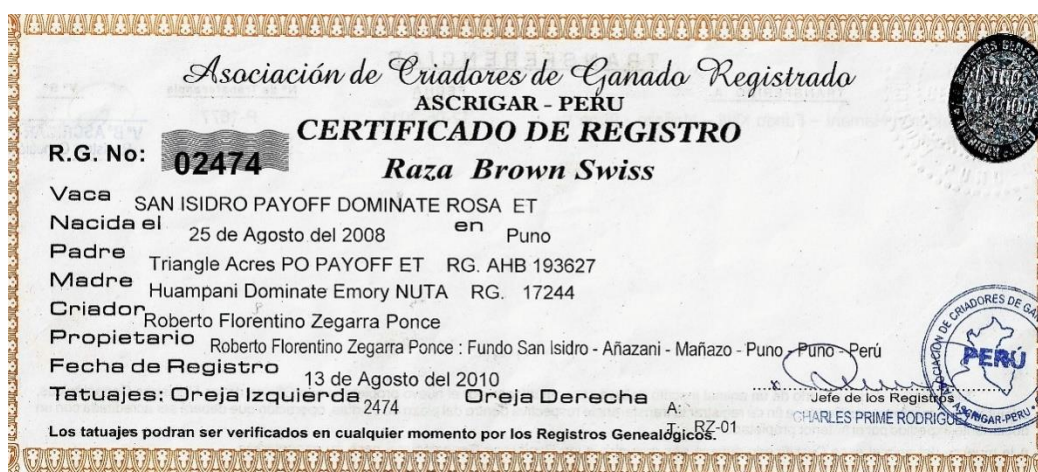


Figura 7. San Isidro Payoff Dominate ROSA ET

MANEJO DE DONADORAS

Aspectos Sanitarios: Despistaje de enfermedades en donantes. - Se envió muestras de sangre a los laboratorios del SENASA Lima y Universidad Nacional Mayor de San Marcos para el descarte de IBR, DVB, Leucosis, TBC, brucelosis. El resultado fue negativo para las enfermedades mencionadas.

Aspectos nutricionales: La alimentación de donantes se realizó en establo, a base de heno de avena ad libitum y suplementación con concentrado elaborado en Mañazo utilizando la metodología "Cuadrado de Pearson" con

insumos adquiridos de Mercados locales, con un aproximado de 17% de Proteína Total y 1.6 Mcal/kg la proporción de insumos mezclados fue el siguiente:

Cuadro 1. Proporción de insumos para alimento balanceado de donantes

INSUMOS	CANTIDAD
Afrecho de cebada	50%
Afrecho de trigo	30%
Pasta de soya	10%
Harina de pescado	9%
Premezcla de sales minerales	1%

De esta mezcla de alimento balanceado se le proporcionó a las donantes la cantidad de 2 Kg. /vaca/día hasta lograr una condición corporal de 3 a 3.5 previo a la ejecución del protocolo de superovulación (**Cuadro 2**).

3.2.2 EMBRIONES. - Los embriones fueron producidos en Mañazo, y criopreservados con etilenglicol en pajuelas de 0.25 ml. El protocolo para la superovulación de las donadoras fue la siguiente:

Cuadro 2. Protocolo de superovulación

DIA	DETALLE
1	P4 + E2
5	FSH
6	FSH
7	FSH + PGF2alfa
8	FSH + retiro de implante
9	CELO e I.A.
16	Colecta de embriones, congelado y almacenamiento.

- **Día 1.-** Inserción de dispositivo intravaginal a base de progesterona + inyección de benzoato de estradiol.

- **Día 5.-** Inyección de Hormona Folículo estimulante (FSH)
- **Día 6.-** Inyección de hormona Folículo estimulante (FSH)
- **Día 7.-** Inyección de hormona Folículo estimulante (FSH) + Prostaglandina F2 α .
- **Día 8.-** Inyección de hormona Folículo estimulante (FSH) + retiro de dispositivo intravaginal.
- **Día 9.-** Detección de celo e inseminación artificial a las 12 horas después del inicio y 12 horas luego de la 1^a inseminación.
- **Día 16.-** Colecta de embriones, congelado y almacenamiento. Se realizó mediante la técnica no quirúrgica esquematizada en la (**Figura 3.**)
- Congelamiento de embriones. - Se realizó mediante la técnica “convencional” descrito por (Palma, 2008), en pajuelas de 0.25 ml y almacenamiento en tanque criogénico con nitrógeno líquido.

El protocolo para la congelación de embriones fue el siguiente:

Cuadro 3. Protocolo de Congelamiento de embriones

PROCESO	DESCRIPCION
Fase de equilibramiento	Embriones son sumergidos en Etilenglycol al 1.5 M + sucrosa.
Seeding	Luego del empajillado se induce a la formación de hielo a una temperatura de -6°C
Descenso de temperatura	Descenso de temperatura a razón de 0.5 °C/min. Hasta -35 °C luego sumergir en nitrógeno líquido
Almacenamiento	En tanque criogénico con nitrógeno líquido.

- **Fase de equilibramiento.** - Consistió en colocar los embriones en solución de Etilenglycol 1.5 M + Sucrosa con un máximo de 10 min. Posteriormente es empajillado.
- **Seeding.**- Una vez empajillado se colocó en el congelador y se bajó su temperatura hasta -6 °C. En este estado se procedió a inducir la formación de cristales en el medio extracelular de los embriones mediante la fricción con nitrógeno líquido de las porciones extremas de la pajueta a la posición del embrión con crioprotector.
- **Descenso de temperatura.**- Posterior al “seeding”, los embriones en pajueta fueron colocados nuevamente en el congelador el cual bajó la temperatura de -6 °C hasta -35°C a razón de 0.5 °C/min.
- **Almacenamiento.**- Luego del descenso de temperatura hasta -35°C, los embriones en pajueta fueron sumergidos directamente en nitrógeno líquido y almacenados en un tanque criogénico.

DESCRIPCION DE LA COLECTA DE EMBRIONES

Donadora	: Huampaní Dominate Emory NUTA	RG. : 17244PERU
Semental	: Cozy Nook Wonderment TRACE	RG. : 68113671USA
Raza	: Brown Swiss	
Propietario	: Asociación GAMA – Mañazo	

Cuadro 4. Estructuras colectadas vaca NUTA

ESTRUCTURAS	CANTIDAD
Embriones viables	18
Embriones no viables	5
Ovocitos	2
Zona pelúcida	2
TOTAL	27



Donadora : Huampaní Collect Pete KIAI **RG. : 17234PERU**
Semental : Lost Elm BELLBOY **RG. :197735USA**
Raza : Brown Swiss
Propietario : Dyoní Calderón Mamani – Mañazo

Cuadro 5. Estructuras colectadas vaca KIAI

ESTRUCTURAS	CANTIDAD
Embriones viables	6
Embriones no viables	7
Ovocitos	0
Zona pelúcida	0
TOTAL	19

Donadora : San Isidro Payoff Dominate ROSA ET **RG. : 17234PERU**
Semental : Hilltop Acres GOLDMINE **RG. :198015USA**
Raza : Brown Swiss
Propietario : Dyoní Calderón Mamani – Mañazo

Cuadro 6. Estructuras colectadas vaca ROSA

ESTRUCTURAS	CANTIDAD
Embriones viables	8
Embriones no viables	3
Ovocitos	1
Zona pelúcida	0
TOTAL	12

3.2.3 RECEPTORAS

Se utilizaron 28 receptoras Brown Swiss PPC con edades aproximadas de 1.5 a 2 años y composición dentaria entre dientes de leche y dos dientes permanentes, las cuales fueron alimentadas en época lluviosa al pastoreo en praderas de alfalfa + Dactylis y suplementadas con heno de avena en comederos y en época seca pastoreo en praderas naturales y suplementación con heno de avena.

La selección de receptoras obedeció a los siguientes criterios:

- Vaquillas con ciclicidad, lo cual se comprobó mediante palpación de ovarios vía transrectal encontrando estructuras como cuerpo lúteo o

folículo terciario, esto corroborado con la información del productor de ocurrencia de celo.

- Vaquillas que anteriormente no hayan tenido servicio de inseminación artificial o monta natural (Información del productor).
- Vaquillas que a la evaluación visual presenten condición corporal entre 2.5 a 3.
- La relación de vaquillas seleccionadas se muestra en los (**Cuadros 14 y 15 del anexo I**).

Las receptoras fueron distribuidas en cuatro lotes formados por 07 animales cada lote, los mismos que han estado identificadas por sus propietarios.

3.2.4 DISTRIBUCION DE VAQUILLAS RECEPTORAS

Las 28 vaquillas receptoras seleccionadas para transferencia de embrión fueron distribuidas de la siguiente manera:

Cuadro 7. Distribución de receptoras para aplicación de hormonas.

DETALLE	HORMONAS				TOTAL
	GnRH		HCG		
DIA	Día 6	Día 7	Día 6	Día 7	
Nº Vaquillas	7	7	7	7	28

3.2.5 HORMONAS APLICADAS PARA FORMACIÓN DE CUERPO LÚTEO ACCESORIO

a.- GnRH (Hormona liberadora de Gonadotropinas)

El producto comercial utilizado fue GESTAR de laboratorios OVER que contiene acetato de buserelina. Se aplicó 20 mcg. por receptora vía intramuscular.

b.- hCG (Gonadotropina Coriónica Humana)

El producto comercial utilizado fue CHORULON de laboratorios Intervet.

La dosis que se utilizó fue 1000 UI vía intramuscular.

Todas las receptoras (28) recibieron la transferencia de 01 embrión descongelado el día 7 posterior al celo natural en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo palpable (**Cuadros 16 y 17 del Anexo 2**).

3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

3.3.1 DETECCIÓN DE CELO

La ocurrencia de celo de las vaquillas fue natural y se detectó visualmente, considerando:

- Edematización y enrojecimiento de la vulva
- Descarga vaginal de mucus cristalino
- Intranquilidad de la vaquilla
- Aceptación a ser montada

3.3.2 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Se realizó mediante las siguientes acciones:

- Determinación de ovario con cuerpo lúteo mediante palpación de ovarios vía transrectal. Para que la vaquilla reciba el embrión se seleccionó aquellas que poseían un cuerpo lúteo palpable sobresaliente con respecto a la superficie del ovario.
- Se vació manualmente el estiércol contenido en el recto de la receptora y posterior lavado y secado de la vulva con agua y jabón.

- Inyección de la anestesia epidural con lidocaína al 2% entre la 1ra. y segunda vértebra coccígea.
- Armado de la pistola de transferencia que consistió en el descongelamiento del embrión en agua a 35°C durante 10 segundos, calentamiento de la pistola de transferencia, cargado de la pajuela previamente cortada en el tapón a la pistola de transferencia y protección de la misma con funda de transferencia de embriones y camiseta sanitaria
- Emplazamiento del embrión en la porción medial del cuerno uterino ipsilateral al ovario con presencia de cuerpo lúteo.

3.3.3 DIAGNÓSTICO DE CUERPO LÚTEO ACCESORIO Y PREÑEZ

El diagnóstico de cuerpo lúteo accesorio se realizó con el uso de ecógrafo transrectal marca Chison D600 con transductor lineal serie 7.5 MHZ y por palpación vía rectal de ovarios 7 días posteriores a la aplicación de GnRH o HCG. El diagnóstico de preñez se realizó por ecografía corroborado por palpación vía rectal de útero grávido 50 días posteriores a la transferencia de embriones a las receptoras que no retornaron en celo, los resultados se muestran en los (**Cuadros 16 y 17 del Anexo 2**).

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La diferencia en el porcentaje de preñez en receptoras con y sin cuerpo lúteo accesorio entre los diferentes grupos fue evaluado con la prueba exacta de FISHER debido al bajo N° de receptoras que recibieron embrión descongelado.

Para el presente trabajo de investigación, se utilizó dos muestras independientes y menores o iguales a 15 ($N \leq 15$), y que son mutuamente excluyentes. La prueba de la probabilidad exacta de Fisher para una tabla de 2x2, es una técnica para

analizar datos discretos cuando dos muestras independientes son pequeñas. El esquema y la fórmula son las siguientes:

Cuadro 8. Esquema estadístico de Fisher

VARIABLE	GRUPO		TOTAL
	I	II	
POSITIVO	A	B	A+B
NEGATIVO	C	D	C+D
TOTAL	A+C	B+D	N

$$p = \frac{(A + B)! (C + D)! (A + C)! (B + D)!}{N! A! B! C! D}$$

Los índices reproductivos para determinar la Eficiencia Reproductiva son las siguientes:

1. Porcentaje de preñez
2. Presencia de cuerpo lúteo accesorio
3. Servicios por concepción

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados logrados en cuanto a los índices reproductivos que se evaluaron, se muestran en el **(Cuadro 9)**.

Cuadro 9. Índices reproductivos logrados

PARAMETROS	HORMONAS			
	GnRH		hCG	
	GnRH día 6	GnRH día 7	hCG día 6	hCG día 7
Total vaquillas transferidas con embrión	7	7	7	7
Nº de vaquillas preñadas	2	3	2	2
Presencia de cuerpo lúteo accesorio	3(42.9%)	3(42.9%)	5(71.4%)	6(85.7%)
Porcentaje de Preñez	28.6%	42.9%	28.6%	28.6%
Servicios por concepción	3.5	2.3	3.5	3.5

4.1. EFICIENCIA REPRODUCTIVA

Para evaluar la eficiencia reproductiva de los dos Grupos (Aplicación de GnRH y aplicación de hCG respectivamente), se tomó en cuenta parámetros reproductivos detallados a continuación:

4.1.1 PORCENTAJE DE PREÑEZ

Cuadro 10. Porcentaje de preñez por Transferencia de Embriones en receptoras con aplicación de GnRH.

VARIABLE	HORMONA GnRH		TOTAL
	Día 6	Día 7	
POSITIVO	2(28.6%)	3(42.9%)	5
NEGATIVO	5(71.4%)	4(57.1%)	9
TOTAL	7	7	14

$$p = 0.3671$$

- a) Nivel de significancia: $\alpha < 0.05$
- b) Como $p = 0.3671 > \alpha = 0.05$, entonces no existe significación estadística.

Cuadro 10. El porcentaje de preñez por transferencia de embriones fue de 28.6% (n=2) cuando se inyectó GnRH el día 6 después del celo natural y de 42.9% (n=3) cuando las receptoras recibieron la inyección de GnRH simultáneamente a la transferencia de embriones el día 7 posterior al celo natural, este resultado muestra un avance significativo en el porcentaje de preñez con embriones descongelados, sin embargo; sometido a la prueba de FISHER no mostró significación estadística. Bó *et al.*, (2012) manifiesta que una estrategia para aumentar la concentración de progesterona circulante en las receptoras es inducir la formación de un cuerpo lúteo accesorio por inducción de la ovulación del folículo dominante de la primera onda alrededor del momento de la transferencia de embriones. Sin embargo, Los resultados no han sido consistentes.

Por otro lado, Marques *et al.*, (2003) y Rodrigues *et al.*, (2003) confirmaron que el uso de GnRH en el momento de la transferencia de embriones es

beneficioso y si aumenta el porcentaje de preñez. En otro trabajo experimental realizado por Tribulo *et al.*, (2005), en un programa de transferencia de embriones a tiempo fijo utilizaron 1500 UI de hCG por receptora en el momento de la transferencia y en otro grupo de receptoras 50 mg de buserelina (análogo de GnRH); lograron 53.8% y 54.2% de preñez respectivamente y concluyeron que el uso de hCG o GnRH en el momento de la transferencia no incrementa la tasa de preñez en receptoras con celo sincronizado.

Ellington *et al.*, (1991) por su parte, aplicó buserelina (análogo de la GnRH) al momento de la transferencia de embriones obteniendo 72% de gestación con respecto al grupo control (68%). Estas consideraciones, y los resultados alcanzados en el presente estudio demuestran la utilidad del uso de la hormona GnRH simultáneamente a la transferencia de embriones descongelados el día 7 post celo natural.

Cuadro 11. Porcentaje de preñez por Transferencia de Embriones en receptoras con aplicación de hCG

VARIABLE	HORMONA hCG		TOTAL
	Día 6	Día 7	
POSITIVO	2(28.6%)	2(28.6%)	4
NEGATIVO	5(71.4%)	5(71.4%)	10
TOTAL	7	7	14

$$p = 0.4406$$

- a) Nivel de significancia: $\alpha < 0.05$
- b) Como $p = 0.4406 > \alpha = 0.05$, entonces no existe significación estadística.

Cuadro 11. El porcentaje de preñez por transferencia de embriones con la aplicación de hCG el día 6 o 7 posterior al celo natural fue de 28.6% para ambos casos. Al análisis estadístico no existe diferencia significativa. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Martínez *et al.*, (2006) quién en un estudio aplicó 1500 UI de hCG al momento de la transferencia de embriones descongelados en 72 receptoras logrando 51.3% de preñez comparado con el grupo control que tuvo 41.4% (n=70) encontrando diferencia significativa.

En otro estudio Nishigai *et al.*, (2002) obtuvieron 67% de preñez, al administrar 1500 UI/vaca de hCG para reforzar la función lútea en el día 6 post estro en receptoras de embriones (congelados). En el presente estudio a diferencia de otros autores el uso de hCG es de menor utilidad en comparación con la GnRH con respecto al porcentaje de preñez, se requiere ampliar el estudio en un número mayor de animales.

4.1.2 PRESENCIA DE CUERPO LÚTEO ACCESORIO PALPABLE

Cuadro 12. Cuerpo lúteo accesorio en vaquillas con aplicación de GnRH

VARIABLE	HORMONA GnRH		TOTAL
	Día 6	Día 7	
POSITIVO	3(42.9%)	3(42.9%)	6
NEGATIVO	4(57.1%)	4(57.1%)	8
TOTAL	7	7	14

$$p = 0.4079$$

- Nivel de significancia: $\alpha < 0.05$
- Como $p = 0.4079 > \alpha = 0.05$, por lo tanto, se concluye que no existe diferencia significativa.

Cuadro 12. La presencia de cuerpo lúteo accesorio palpable en las receptoras se obtuvo en el 57.1% cuando se inyectó GnRH el día 6 o el día 7 después del celo natural, estadísticamente no existe diferencia significativa con referencia al día de aplicación. Estos resultados son similares a los obtenidos por Fonseca *et al.*, (2001) quien en un estudio de transferencia de embriones descongelados en novillas administró GnRH en el 5º día posterior al celo logrando cuerpo lúteo accesorio palpable en el 41.7%.

En otro trabajo con fines experimentales realizado por Gatica, (2006), se utilizó GnRH en vacas el día 7 después del celo para lograr un cuerpo lúteo accesorio obteniendo 87,5% de vacas con presencia de cuerpo lúteo accesorio evaluado cuatro días después de su aplicación, del mismo modo; Rendel, (1997) utilizó GnRH (Buserelina) en vacas holstein el día 7 después de la inseminación artificial, encontrándose cuerpo lúteo accesorio en el 78.7% de las vacas tratadas. En el presente trabajo el uso de GnRH en receptoras de embriones produjo cuerpo lúteo accesorio en porcentaje inferior a lo logrado con el uso de hCG, esta característica también es reportada por los autores mencionados.

Cuadro 13. Cuerpo lúteo accesorio en receptoras con aplicación de hCG

VARIABLE	HORMONA hCG		TOTAL
	Día 6	Día 7	
POSITIVO	5(71.4%)	6(85.7%)	11
NEGATIVO	2(28.6%)	1(14.3%)	3
TOTAL	7	7	14

$$p = 0.4038$$

- a) Nivel de significancia: $\alpha < 0.05$
- b) Como $p = 0.4038 > \alpha = 0.05$, por lo tanto, se concluye que no existe diferencia estadística significativa.

Cuadro 13. Se encontró cuerpo lúteo accesorio en el 85.7% de receptoras que recibieron 1000 UI de hCG el día 7 posterior al celo natural y en el 71.4% de receptoras que recibieron la misma dosis de hCG el día 6 demostrando ser más beneficioso que la GnRH con fines de formación de cuerpo lúteo accesorio. La mayor respuesta del uso de hCG fue también demostrado por Gatica, (2006) quién con el objetivo de lograr un cuerpo lúteo accesorio utilizó GnRH y hCG en vacas el día 7 después del celo obteniendo 100% con el uso de hCG frente a 87,5% con el uso de GnRH.

En otro estudio Wallace *et al.*, (2011) utilizó 1000 UI de hCG por receptora el día 7 simultáneamente a la transferencia de embriones descongelados en receptoras de razas cárnicas; obtuvo cuerpos lúteos accesorios logrando 58.6% de preñez con respecto al grupo control (51.3%).

La hCG se ha aplicado en tratamientos de sincronización el día 6, obteniéndose tasas de preñez más altas frente a grupos sin la aplicación de esta hormona. Estos resultados igualmente sugieren que la hCG, la cual tiene acción LH, dependiendo del día de su aplicación induce la ovulación y la formación de cuerpos lúteos accesorios, los cuales incrementan la concentración de P4 plasmática y la tasa de preñez en hembras receptoras de embriones bovinos (Baruselli *et al.*, 2003), sin embargo; en el presente trabajo a pesar de que la hCG fue más útil que

la GnRH en la formación de cuerpo lúteo accesorio no fue superior en el porcentaje de preñez.

CONCLUSIONES

- Se ha demostrado que la mejor eficacia en la formación de cuerpo lúteo accesorio palpable en vaquillas receptoras de embriones es producto de la aplicación de hCG el día 7 post celo (día de la transferencia de embriones) comparado con el uso de GnRH.
- El porcentaje de preñez por transferencia de embriones con aplicación de GnRH el día 7 (42.9%) supera a lo logrado con aplicación de hCG (28.6%).
- El porcentaje de preñez por transferencia de embriones fue de 28.6% para el grupo de receptoras que recibieron GnRH el día 6 post celo y de 42.9% para el grupo de receptoras que recibieron GnRH simultáneamente con la transferencia de embriones el día 7 posterior al celo. Del mismo modo el porcentaje de preñez fue de 28.6% para el grupo de receptoras que recibieron hCG el día 6 post celo y de 28.6% para el grupo de receptoras que recibieron una dosis de hCG el día 7 post celo simultáneamente con la transferencia de embriones.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios más amplios sobre el uso de la GnRH de aplicación simultánea a la transferencia de embriones (día 7 post celo) para el incremento del porcentaje de preñez, su superioridad con respecto al uso de hCG se ha demostrado en el presente estudio, sin embargo, debido al bajo N° de receptoras trabajadas; ha inducido a realizar la prueba estadística de Fischer en la cual no mostró significancia estadística.
- Los laboratorios de reproducción animal deben de implementarse con equipos para producción de embriones in vitro, para garantizar la disposición de embriones con desarrollo adecuado al día 7 a bajos costos.
- Realizar estudios sobre la transferencia de 02 embriones sexados en receptoras con cuerpos lúteos accesorios, se espera que esta estrategia elevará el porcentaje de preñez evitando las “decepciones” de los productores que utilizan esta tecnología reproductiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G.P., JDams, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69:72-80.
- Alila, H.W., & Dowd, J.P. (1991). The control of corpus luteum function in domestic ruminants. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 13: 203-237.
- Arvizu, R., Hernandez-Ceron, J., Alberti, A., Porras, A., & Valencia, M.J. (1995). Inicio de la actividad ovárica posparto y características de la primera ovulación de cabras criollas paridas en dos épocas del año. *Avances en Inv. Agropecuaria* 4: 9-15.
- Baruselli, P., Marques, O., Nasser, L.F., Reis, E.L., & Bó G. (2003). Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR–B devices for timed artificial insemination. *Theriogenology*. 59: 214.
- Baird, D.T., & Land, R.B.; (1973). Division of the uterine vein and the function of the adjacent ovary in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 33; 393.

- Baker, T.G., (1976). Primordialekeimzellen/oogenese und ovulation. Berlin, Hamburg.
- Berhmann, H.R., Mc Doanld, G.J., & Greep, R.O., (1971). Regulation of ovarian cholesterol esters. Evidence for the enzymatic sites of prostaglandins induced loss of corpus luteum function.
- BÓ, G.A., Baruselli, P.S., & Mapletoft, R.J. (2012). Increasing pregnancies following synchronization of bovine recipients. CBRA. Anim Reprod, v.9, n.3, p.312-317, Jul./Sept.
- CIETE (Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones) (2008). Apuntes del Curso de Transferencia de embriones en Bovinos. UNA – La Molina.
- CIETE (Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones) (2002). Apuntes del I Curso de Transferencia de embriones en vacunos. Chuquibambilla - UNA Puno.
- Bem, A.R. de, Rumpf, R., & Sousa, R.V. (1994). Tecnología de embriones bovinos un instrumento de mejoramiento genético animal. Manual INIA Lima – Perú.
- Docke, F. (1980). Intraovarielle regulations prozesseim Zyklus. Mhft. Vet. Med. 35. 829.
- Docke, F. (1981). Vetrinarmedizinischeendokrinologie, 2 Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena.

- Ellington, J.E., Foote, R.H., Farrell, P.B., Hasler, J.F., Webb, J., Henderson, W.B., & Mc Grath, A.B. (1991). Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*. Volume 36: 1035-1042.
- Escalera, J.F, Rangel, R., Rodriguez De Lara, J. G., García, M., & C. Sanchez Del Real. (2005). Efecto de la administración de HCG sobre la formación de cuerpos lúteos en vacas Holstein. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. De Mex.
- Elsden, R.P., & Seidel, G.E. Jr., (1986). Procedimientos para recolección, división, congelación y transferencia de embriones bovinos. Laboratorio de Reproducción Animal. Colorado State University. Boletín N° 2.
- Farin, C.E., Moeller, C.L., Sawyer, H.R., Gamboni, F., & Niswender, G.D. (1986). Morphometric analysis of celltypes in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 35: 1299-1308.
- Fitz, T.A., Mayan, M.H., & Sawyer, H.R., (1982). Characterization of two Stereoidogenic cell types in the corpus luteum. *Biol, Reprod.* 27; 703.
- Fonseca, J.F., J.M. Silva Filho, J.M., Palhares, M.S., Ruas, J.R.M., & Pinto Neto, A. (2001). Concentração plasmática de progesterona em novilhas receptoras submetidas à administração de rbST, GnRH ou hCG no quinto dia do ciclo estral. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.53 no.4 Belo Horizonte.

- Gatica, R., (2006). Apuntes del I Curso Internacional de Manejo Reproductivo en vacas Lecheras. Perulactea. Arequipa. Perú.
- Gorlach, A. (1997). Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Editorial Acribia España.
- Hafez, E.S.E. (1987). Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 5ª Edición. Editorial Interamericana.
- Hansel, W., Alila, H.W., Dowd, J.P., & Milvae, R.A. (1991). Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *J. Reprod. Fertil.* (Supp143): 77-89,1991.
- Hansel, W., & Convey, M.E. (1983). Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 57 (Supp12): 404-424.
- IRAC (2003). 5º Simposio Internacional de Reproducción Animal. Buenos Aires Argentina.
- Karsch, F.J., Moenter, S.M., & Caraty, A. (1992). The neuroendocrine signal for ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 329-341.
- Kastelic, J.P., & Mapletoft, R.J. (2003). Causas no infecciosas de muerte embrionaria en ganado bovino. 5º Simposio Internacional de Reproducción Animal. Buenos aires Argentina.
- Kerbler, T.L., Buhr, M.M., Jordan, L.T., Leslie, K.E., & Walton, J.S., (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by conceptus in cattle. *Theriogenology*47: 703-714.

- Kimura, M., Nakao, T., Moriyoshi, M., & Kawata, K., (1987). Luteal Phase deficiency as a possible cause of repeat breeding in dairy cows. *Br. Vet. J.* 143:560-566.
- Lamming, G.E., & Mann, G.E., (1995). A dual role for progesterone in the control of cyclicity in ruminants. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl 49): 561-566.
- Mann, G.E., & Lamming, G.E.,(1999). The Influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dom Anim* ;34:269-274.
- Mann, G.E., & Lamming, G.E., (1995). Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. *J Reprod Fertil.* 104:1-5.
- Marques, M.O., Nasser, L.F., Silva, R.C.P., BÓ, G.A., & Baruselli, P.S. (2003). Increased pregnancy rates in *Bos taurus* x *Bos indicus* embryo recipients with treatments that increase plasma progesterone concentrations. *Theriogenology*, 59:369. (abstract).
- Martinez, G.R., Hernandez, J.I., Mendez, P.N., Vasquez, F.F., Huerta, C.R., José del Carmen Rodriguez, C.J. del C., & Mendez, M.M. (2006). 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. 2º Congreso Internacional en Ciencias Veterinarias y Zootecnia. Pag. 48-59.
- Niswender, G.D., & Nett, T.M., (1994). Corpus luteum and its control in infraprimate species. In *The Physiology of Reproduction*. 2 Ed. Ed. Knobil, E. and Neill, J.D. Raven Press, Ltd. New York.

- Nishigai, M., Kamomae, H., Tanaka T., & Kaned Y., (2002). Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred Frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 58: 1597-1606.
- Palma, G.A., (2008). *Biología de la Reproducción*. 2da Edición. Impreso en talleres de Pugliese y Siena – Producción gráfica Integral. Alta Cordoba. Argentina, 2008.
- Pritchard, J.Y., Schrick, F.N., & Inskeep, E.K., (1994). Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesterone and estradiol in beef cows. *Theriogenology*42: 247-259.
- Pope, W. F, Cardenas, H., Wiley, T.M., & Mc Clure, K.M., (1995). Dose-response relationship of exogenous progesterone shortly after ovulation on estrous cycle length blastocyst development and fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 38:109-117.
- Quirke, J.F., Hanrahan, J.P., & Gosling, J.P., (1979). Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fertil.* 55: 37-44.
- Ramon, V.J., (1997). Factores de mortalidad embrionaria en ovejas. *Agrociencia*31: 113-120.
- Rendel, A. K., (1997). Efecto de GnRH (Buserelina) en vacas de lechería, inyectada el día 0 o 7 Post Inseminación Artificial. Tesis de grado Valdivia Chile.

- Roberts, R.M., & Hazer, F.W. (1988). The functions of uterine secretions. *J. Reprod. Fertil.* 82: 875-892.
- Rodrigues, C.A., Mancilha, R.F., Dalalio, M., Reis, E.L., Nichi, M., Madureira, E.H., & Baruselli, P.S. (2003). Increase of conception rates in IVF embryo recipients treated with GnRH at embryo transfer moment. *Acta Scient Vet*, 33:550-551. (abstract).
- Rosemberg, M., Herz, Z., Davidson, M., & Folman, Y. (1997). Seasonal variations in post-partum plasma progesterone levels and conception in primiparous and multiparous dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 51: 363-367.
- Silva, W.J., Fitz, T.A., Mayan, M.H., & Niswender, G.D. (1984). Cellular and molecular mechanisms involved in luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe. *Developments in animal and veterinary science*.
- Shelton, K., Gayerie, De Abreu, M.F., Hunter, M.G., Parkinson, T.J., & Lamming, G.E. (1990). Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J. Reprod. Fertil.* 90: 1-10.
- Smith, M.F., Mc Intush, E.V., & Smith, G.W. (1994). Mechanisms associated with corpus luteum development. *J. Anim. Sci.* 72: 1857-1872.
- Thatcher, W.W., Macmillan, K.L., Hansen, P.J., & Drost, M. (1989). Concepts for regulation of corpus luteum function by conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31: 149-164.

- Thatcher, W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B., & Schmitt, E.P. (1994). Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci. (Suppl.72)* 3: 16-30.
- Thatcher, W.W., & Santos, J.E.P. (2001). Caracterización de la Muerte Embrionaria Temprana y Prevención de la Pérdida de Gestaciones. *ABS. USA. Journal*.
- Tribulo, R., Balla, E., Cutaia, L., BÓ, G.A., Baruselli, P.S., & Peres, L. (2005). Effect of treatment with HCG or GnRH at the time of embryo transfer on pregnancy rates in cows synchronized with progesterone vaginal devices, estradiol benzoate, and eCG. *Rep. Fert. Dev.* 17 : 234-234.
- Villa-Godoy, A., Hughes, T.L, Emer, R.S., Chapin, L.T., & Fogwell, R.L. (1998). Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:1063-1072.
- Wallace, L.D., Breiner, C.A., Breiner, R.A., Spell, A.R., Carter, J.A., Lamb, G.C., & Stevenson, J.S. (2011). Administration of human chorionic gonadotropin at embryo transfer induced ovulation of a first wave dominant follicle, and increased progesterone and transfer pregnancy rates. *Theriogenology*. 2011, May, 75.
- Wiltbank, M.C., & Niswender, G.D. (1992). Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 103-110.



ANEXOS

Anexo 1. SELECCIÓN DE RECEPTORAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO**Cuadro 14.** Grupo de receptoras para la aplicación de GnRH

N°	FECHA DE REVISION	RECEPTORA	ESTRUCTURAS PALPADAS EN OVARIOS	PROPIETARIO	OBSERVACIONES
1	5/03/2016	Marcelina	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
2	5/03/2016	Hilda	Sin estructuras	Comunidad campesina Vizcachani	
3	5/03/2016	Maria	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
4	5/03/2016	Catalina	Folículo	Comunidad campesina Vizcachani	
5	5/03/2016	Marilin	Folículo	Comunidad campesina Vizcachani	
6	5/03/2016	Yolita	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
7	5/03/2016	Marina	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
8	5/03/2016	Manuela	Folículo	Comunidad campesina Vizcachani	
9	5/03/2016	Camucha	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
10	5/03/2016	Cebosa	Sin estructuras	Comunidad campesina Vizcachani	
11	5/03/2016	Mabel	Sin estructuras	Comunidad campesina Vizcachani	
12	5/03/2016	Cecilia	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
13	5/03/2016	Yuliza	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
14	5/03/2016	Mocosa	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
15	5/03/2016	Monchi	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
16	5/03/2016	Sara	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
17	5/03/2016	Negra	Cuerpo lúteo	Comunidad campesina Vizcachani	
18	5/03/2016	Clorinda	Sin estructuras	Comunidad campesina Vizcachani	
19	5/03/2016	Kiara	Sin estructuras	Comunidad campesina Vizcachani	
20	5/03/2016	Petunia	Sin estructuras	Comunidad campesina Vizcachani	

Cuadro 15. Grupo de receptoras para la aplicación de hCG

N°	FECHA DE REVISION	RECEPTORA	ESTRUCTURAS PALPADAS EN OVARIOS	PROPIETARIO	OBSERVACIONES
1	05/07/2014	Paola	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	
2	05/07/2014	Luisa	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	
3	05/07/2014	Barrosa	Cuerpo lúteo	Dyoni Calderón Mamani	
4	05/07/2014	Flaca	Cuerpo lúteo	Dyoni Calderón Mamani	
5	05/07/2014	Mora	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	
6	05/07/2014	Comadre	Cuerpo lúteo	Amparo Pacheco	
7	05/07/2014	Cindy	Cuerpo lúteo	Amparo Pacheco	
8	05/07/2014	Mora	Sin estructuras	Guido Ortega Achata	
9	05/07/2014	Lisa	Sin estructuras	Guido Ortega Achata	
10	05/07/2014	Yessica	Folículo terciario	Guido Ortega Achata	
11	05/07/2014	Lola	Folículo terciario	Guido Ortega Achata	
12	05/07/2014	Princesa	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	
13	05/07/2014	Primera	Sin estructuras	Guido Ortega Achata	
14	05/07/2014	Bony	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	
15	05/07/2014	Sola	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	
16	05/07/2014	Cachuda	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	
17	05/07/2014	Paty	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	
18	05/07/2014	Sandy	Sin estructuras	Guido Ortega Achata	
19	05/07/2014	Marcia	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	
20	05/07/2014	Pamela	Cuerpo lúteo	Guido Ortega Achata	

Anexo 2. DETALLES DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Cuadro 16. Transferencia de embriones (Hormona GnRH)

N°	RECEPTORA	CUERPO LUTEO PALPABLE	INYECCION DE GnRH		TRANSFERENCIA			OBSERVACIONES
			DIA 6	DIA 7	FECHA	CUERNO	EMBRION(*)	
1	Marcelina	Si		Si	23/03/2016	Derecho	M0	
2	Hilda	Si		No	No	No	No	CL pequeño
3	Maria	Si		Si	22/03/2016	Izquierdo	M0	
4	Catalina	Si		Si	22/03/2016	Derecho	M0	
5	Marilin	Si		Si	22/03/2016	Derecho	M0	
6	Yolita	No		No	No	No	No	
7	Marina	Si		Si	24/03/2016	Izquierdo	M1	
8	Manuela	Si		Si	23/03/2016	Izquierdo	BI0	
9	Camucha	Si		Si	23/03/2016	Derecho	M0	
10	Cebosa	Si		No	No	No	No	CL pequeño
11	Mabel	Si	No		No	No	No	CL pequeño
12	Cecilia	No	No		No	No	No	Quiste folicular
13	Yuliza	Si	Si		24/03/2016	Derecho	BI0	
14	Mocosa	Si	Si		24/03/2016	Derecho	M0	
15	Monchi	Si	Si		22/03/2016	Derecho	M0	
16	Sara	Si	Si		22/03/2016	Derecho	M1	
17	Negra	Si	Si		22/03/2016	Derecho	M1	
18	Clorinda	Si	Si		22/03/2016	Derecho	M0	
19	Kiara	Si	Si		23/03/2016	Izquierdo	M0	
20	Petunia	No	No		No	No	No	

(*) ESTADÍO DEL EMBRIÓN: (Fuente: CIETE, 2008).

- M0 : Mórula compacta Excelente
- M1 : Mórula compacta buena
- BI0 : Blastocisto excelente

Cuadro 17. Transferencia de embriones (HORMONA hCG)

N°	RECEPTORA	CUERPO LÚTEO PALPABLE	INYECCIÓN DEhCG		TRANSFERENCIA			OBSERVACIONES
			DIA 6	DIA 7	FECHA	CUERNO	EMBRIÓN(*)	
1	Paola	Si	Si		13/07/2014	Derecho	M1	
2	Luisa	No	No	No	No	No	No	Quiste folicular
3	Barrosa	Si	Si		25/07/2014	Izquierdo	M1	Sangre en la funda
4	Flaca	Si	Si		57/07/2014	Derecho	M1	
5	Mora	Si	Si		30/07/2014	Derecho	M1	
6	Comadre	Si	Si		11/03/2015	Izquierdo	M1	
7	Cindy	No	No	No	No	No	No	Sin estructuras
8	Mora	Si	Si		30/03/2015	Derecho	BI0	
9	Lisa	Si	Si		25/03/2015	Derecho	M0	
10	Yessica	Si	Si		06/06/2015	Derecho	M1	
11	Lola	Si		Si	13/09/2015	Derecho	M1	
12	Princesa	Si		Si	15/09/2015	Izquierdo	M1	
13	Primera	No		No	No	No	No	Quiste folicular
14	Bony	Si		Si	10/10/2015	Derecho	M1	
15	Sola	Si		Si	15/09/2015	Derecho	M1	
16	Cachuda	Si		Si	04/04/2015	Derecho	M1	
17	Paty	Si		Si	07/09/2014	Derecho	M1	
18	Sandy	Si	No	No	No	No	No	CL pequeño
19	Marcia	No	No	No	No	No	No	
20	Pamela	No	No	No	No	No	No	

(*) **ESTADÍO DEL EMBRIÓN:** (Fuente: CIETE, 2008).

- M0 : Mórula compacta Excelente
- M1 : Mórula compacta buena
- BI0 : Blastocisto excelente

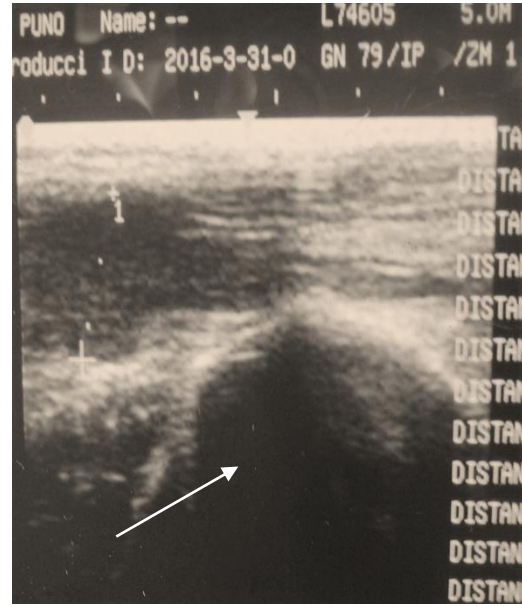
Cuadro 18. Diagnóstico de cuerpo lúteo accesorio y preñez con aplicación de GnRH

N°	RECEPTORA	CUERPO LUTEO NATURAL PALPABLE		INYECCION DE GnRH	CUERPO LUTEO ACCESORIO PALPABLE		DIAGNOSTICO DE PREÑEZ
		OVARIO DERECHO	OVARIO IZQUIERDO		OVARIO DERECHO	OVARIO IZQUIERDO	
1	Marcelina	Si		Día 7		Si	Positivo
2	Maria		Si	Día 7	Si		Negativo
3	Catalina	Si		Día 7	No	No	Negativo
4	Marilin	Si		Día 7	No	No	Negativo
5	Marina		Si	Día 7	No	No	Positivo
6	Manuela		Si	Día 7	Si		Negativo
7	Camucha	Si		Día 7	No	No	Positivo
8	Yuliza	Si		Día 6	No	No	Negativo
9	Mocosa	Si		Día 6		Si	Negativo
10	Monchi	Si		Día 6	No	No	Positivo
11	Sara	Si		Día 6		Si	Positivo
12	Negra	Si		Día 6	No	No	Negativo
13	Clorinda	Si		Día 6	No	No	Negativo
14	Kiara		Si	Día 6	Si		Negativo

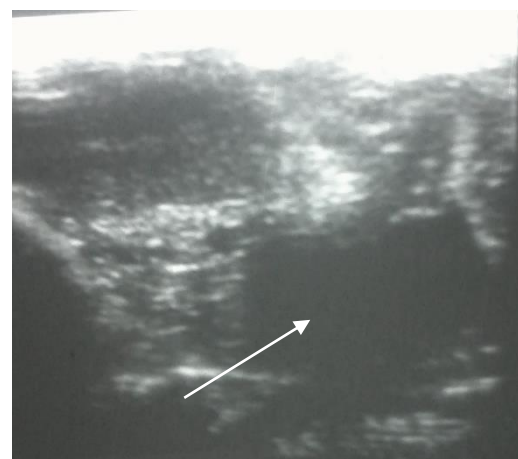
Cuadro 19. Diagnóstico de cuerpo lúteo accesorio y preñez con aplicación de hCG

N°	RECEPTORA	CUERPO LUTEO NATURAL PALPABLE		INYECCION DE GnRH	CUERPO LUTEO ACCESORIO PALPABLE		DIAGNOSTICO DE PREÑEZ
		OVARIO DERECHO	OVARIO IZQUIERDO		OVARIO DERECHO	OVARIO IZQUIERDO	
1	Paola	Si		Día 6		Si	Negativo
2	Barrosa		Si	Día 6	No	No	Positivo
3	Flaca	Si		Día 6	Si	Si	Negativo
4	Mora	Si		Día 6	Si	Si	Negativo
5	Comadre		Si	Día 6	No	No	Positivo
6	Mora	Si		Día 6		Si	Negativo
7	Lisa	Si		Día 6		Si	Negativo
8	Yessica	Si		Día 7	Si		Negativo
9	Lola	Si		Día 7		Si	Negativo
10	Princesa		Si	Día 7	Si		Negativo
11	Bony	Si		Día 7	No	No	Negativo
12	Sola	Si		Día 7		Si	Negativo
13	Cachuda	Si		Día 7	Si	Si	Positivo
14	Paty	Si		Día 7	Si	Si	Positivo

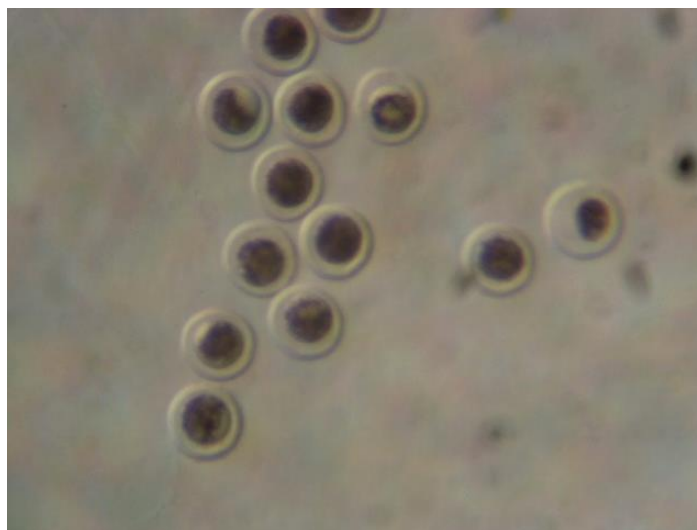
Anexo 3. MUESTRAS ECOGRÁFICAS DE CUERPO LÚTEO ACCESORIO



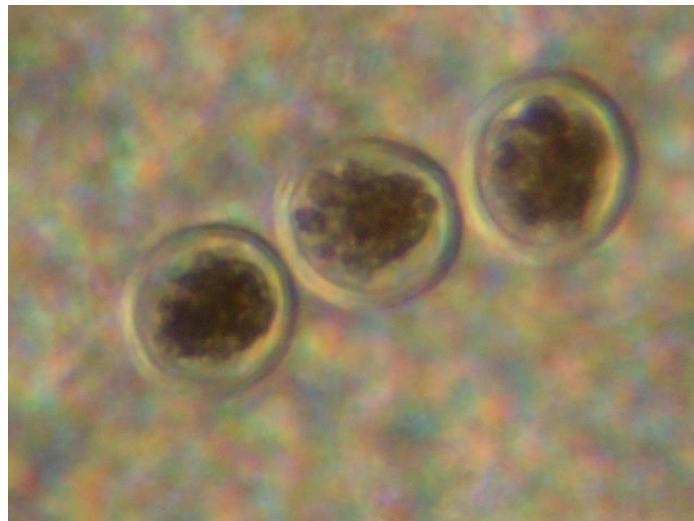
El área señalado muestra ecográficamente un cuerpo lúteo de ovulación normal en ovario izquierdo (fotografía izquierda) y cuerpo lúteo accesorio inducido en ovario derecho (fotografía derecha)



El área señalada muestra ecográficamente un cuerpo lúteo accesorio inducido en ovario izquierdo (fotografía izquierda) y cuerpo lúteo de ovulación normal en ovario derecho (fotografía derecha)

Anexo 4. EMBRIONES PRODUCIDOS Y SELECCIONADOS PARA CONGELAR

Embriones de diferente estadio.- Seleccionados para congelamiento (Blastocistos, mórulas compactas, blastocisto inicial). Nótese en todos ellos la zona pelúcida intactas, forma esférica y espacio perivitelino definido.



Mórulas compactas de calidad Excelente.- Blastómeros definidos, zona pelúcida intacta, espacio perivitelino definido.

Anexo 5. CRÍAS NACIDAS POR TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DE RECEPTORAS CON APLICACIÓN DE hCG



CBP GoldminePayoff KARINA ET
Edad: 2 días
Propietaria: Amparo Pacheco

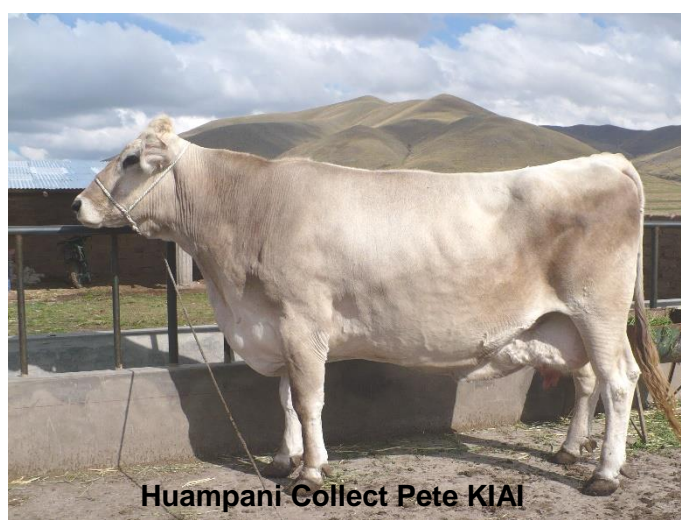


ESI Trace Dominate BLANCA ET
Edad: 01 semana
Propietario : Guido Ortega Achata



Kiwi Zeus Collection SULTAN ET
Edad: 01 semana
Propietario: Dyoni Calderón Mamani

Anexo 6. DONADORAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO PARA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES



Anexo 7. PRODUCTOS HORMONALES UTILIZADOS EN RECEPTORAS

1. CHORULON

Descripción

Chorulon® contiene la hormona Gonodotrofina coriónica humana (hCG) en forma de polvo blanco cristalino liofilizado, para el control de problemas de fertilidad en hembras Bovinas, Equinas y Caninas.

Composición

Cada frasco de material liofilizado contiene 5000 UI de Gonadotrofina coriónica (hCG). Cada frasco de diluyente contiene 5 ml de solución tampón estéril.

Modo de acción

El principio activo de Chorulon® es hCG, una glicoproteína compleja con actividad de hormona luteinizante (LH). En la hembra, la hCG se puede utilizar para estimular la maduración del folículo en desarrollo e inducir la ovulación que desencadene la luteinización de las células de la granulosa, para mantener la vida funcional del cuerpo lúteo y aumentar la secreción de progesterona por las células luteinizadas. La hCG también aumenta la acción de FSH sobre el crecimiento ovárico. En el macho, la hCG estimula la producción de testosterona en influye en desarrollo y mantención de los caracteres sexuales masculinos primarios y secundarios.

Indicaciones

Chorulon® puede ser usado para el control de problemas de fertilidad en animales domésticos:

- Mejorar la tasa de concepción en vacas
- Inducción de la ovulación en yeguas y perras.
- Quistes ováricos con ciclo estral irregular, ninfomanía, o ausencia de estro en vacas.

- Anestro persistente en yeguas y perras.
- Ovulación retardada / estro prolongado en perras.

Dosis y administración:

Espece animal	Indicación	Dosis	Administración
Vaca, vaquilla	Mejorar tasa de concepción	1500 U.I. al momento de la I.A. ó monta.	i.m. ói.v.
	Enfermedad de ovarios quísticos (anestros, estro prolongado, ninfomanía)	3000 U.I.	i.v.
Yegua	Anestros (folículo \geq 2 cm diámetro)	1500 - 3000 U.I. Repetir si fuese necesario a los 2 días.	i.m. ói.v.
	Inducción de la ovulación (folículos \geq 3,5 cm diámetro)	1500 - 3000 U.I. 24 horas antes de la I.A. ó monta	i.m. ói.v.
Perra	Anestro	Después del pretratamiento con PMSG (Folligon), 500 U.I. al primer día de estro.	i.m. ói.v.
	Ovulación retardada	100 - 800 U.I./día	i.m.
Perro	Criptorquidismo	100-500 U.I. dos veces por semana, hasta 6 semanas	i.m.
	Falta de libido	100-500 U.I. 6-12 horas antes de la crusa	i.m.

Período de resguardo

Cero días.

Presentación

Estuche con 5 frascos de material liofilizado que contienen 5000 U.I. de Gonadotrofina coriónica (hCG) por frasco, acompañado de 5 frascos de diluyente de 5 ml c/u.

Condiciones de almacenamiento

Almacenar a una temperatura entre 8°C y 15°C el producto liofilizado y entre 2° C a 8°C después de reconstituido. Proteger de la luz.

Contraindicaciones

Ninguna.

Precauciones y advertencias

En casos aislados, al igual que con todos los preparados proteicos, se pueden presentar reacciones anafilácticas poco después de su aplicación. En tales circunstancias, el tratamiento indicado es una administración de Adrenalina (1:1000) por vía intramuscular ó endovenosa. También puede estar indicada la terapia con glucocorticoides.

2. GESTAR**Descripción:**

Solución lista para usar, que contiene la hormona liberadora de las gonadotrofinas, sintética, que estimula la liberación de FSH (Hormona folículo estimulante) y LH (Hormona luteinizante).

Fórmula:

Cada 100 ml contiene:

- * Benzoato Acetato de Buserelina 0,00042 g
- * Agentes de Formulación c.s.

Especies animales a las que se destina:

Bovinos, equinos.

Administración:

Vía intramuscular, subcutánea o endovenosa.

Dosificación:*** Vacas:**

- Quistes foliculares, aciclia, anestro: 5 ml.
- Ovulación retardada, atresia folicular: 2,5 ml.
- Incremento del índice de concepción en la inseminación artificial y tras la sincronización de celo: 2,5 ml.

*** Yeguas:**

- Trastornos quísticos de ovario con o sin celo prolongado o permanente: 10 ml.

- Aciclia: dos veces 5 ml a intervalo de 24 horas.
- Inducción de la ovulación: 10 ml.
- Fijar el tiempo de ovulación y monta: 10 ml.
- Mejora el índice de concepción: 10 ml.
- Celos prolongados o permanentes: 10 ml.

Presentación:

Frasco de 50 ml contenido neto y caja con 12 frascos de 10 ml de contenido neto.

Anexo 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Probabilidad exacta de Fisher

Para el presente trabajo de investigación, se utilizó dos muestras independientes y menores o iguales a 15 ($N \leq 15$), y que son mutuamente excluyentes. La prueba de la probabilidad exacta de Fisher para una tabla de 2x2, es una técnica para analizar datos discretos cuando dos muestras independientes son pequeñas. El esquema y la fórmula son las siguientes:

Variable	GRUPO		Combinación
	I	II	
POSITIVO	A	B	A+B
NEGATIVO	C	D	C+D
TOTAL	A+C	B+D	N

$$p = \frac{(A+B)!(C+D)!(A+C)!(B+D)!}{N!A!B!C!D!}$$

RESULTADOS DE PORCENTAJE DE PREÑEZ CON APLIACIÓN DE GnRH

The SAS System

Obs	PRENNEZ	GNRH	COUNT
1	SI	GNRH6	2
2	SI	GNRH7	3
3	NO	GNRH6	5
4	NO	GNRH7	4

The SAS System

The FREQ Procedure
Table of PRENNEZ by GNRH

PRENNEZ	GNRH		Total
Frequency,			
Percent ,			
Row Pct ,			
Col Pct ,	GNRH6	GNRH7	
NO	5	4	9
	35.71	28.57	64.29
	55.56	44.44	
	71.43	57.14	
SI	2	3	5
	14.29	21.43	35.71
	40.00	60.00	
	28.57	42.86	
Total	7	7	14
	50.00	50.00	100.00

Statistics for Table of PRENNEZ by GNRH

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.3111	0.5770
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.3127	0.5760



```
Continuity Adj. Chi-Square    1    0.0000    1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square  1    0.2889    0.5909
Phi Coefficient              0.1491
Contingency Coefficient      0.1474
Cramer's V                   0.1491
WARNING: 100% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.
```

```
Fisher's Exact Test
#####
Cell (1,1) Frequency (F)    5
Left-sided Pr<= F          0.8671
Right-sided Pr>= F         0.5000
```

```
TableProbability (P)        0.3671 como p = 0.3671 >α = 0.05, entonces no existe
significación estadística.
Two-sided Pr <= P          1.0000
SampleSize = 14
```

Para PORCENTAJE DE PREÑEZ ES EL MISMO VALOR p=0.3671 >α=0.05 (no significativo).

RESULTADOS DE PORCENTAJE DE PREÑEZ POR TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN VAQUILLAS CON APLICACIÓN DE hCG.

Obs	PRENNEZ	GNRH	COUNT
1	SI	GNRH6	2
2	SI	GNRH7	2
3	NO	GNRH6	5
4	NO	GNRH7	5

Table of PRENNEZ by GNRH

PRENNEZ	GNRH		Total
Frequency,			
Percent ,			
Row Pct ,			
Col Pct ,	GNRH6	GNRH7	
NO	5	5	10
	35.71	35.71	71.43
	50.00	50.00	
	71.43	71.43	
SI	2	2	4
	14.29	14.29	28.57
	50.00	50.00	
	28.57	28.57	
Total	7	7	14
	50.00	50.00	100.00

Statistics for Table of PRENNEZ by GNRH

```
Statistic    DF    Value    Prob
#####
Chi-Square    1    0.0000    1.0000
Likelihood Ratio Chi-Square  1    0.0000    1.0000
Continuity Adj. Chi-Square  1    0.0000    1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square  1    0.0000    1.0000
Phi Coefficient    0.0000
Contingency Coefficient    0.0000
Cramer's V        0.0000
```

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

```
Fisher's Exact Test
#####
Cell (1,1) Frequency (F)    5
Left-sided Pr<= F          0.7203
Right-sided Pr>= F         0.7203
```

```
TableProbability (P)        0.4406 como p = 0.4406 >α = 0.05, entonces no existe
```




Two-sided Pr<= P 1.0000 diferenciaestadísticasinificativa.
 SampleSize = 14
 PARA EL PORCENTAJE DE PREÑEZ es el mismo VALOR DE p=0.4406 que no es significativo.

PRESENCIA DE CUERPO LUTEO ACCESORIO PALPABLE.

Obs	PRENNEZ	GNRH	COUNT
1	SI	GNRH6	3
2	SI	GNRH7	3
3	NO	GNRH6	4
4	NO	GNRH7	4

Table of PRENNEZ by GNRH

PRENNEZ	GNRH		Total
Frequency,			
Percent ,			
Row Pct ,			
Col Pct ,GNRH6 ,GNRH7 ,			
NO	4	4	8
	28.57	28.57	57.14
	50.00	50.00	
	57.14	57.14	
SI	3	3	6
	21.43	21.43	42.86
	50.00	50.00	
	42.86	42.86	
Total	7	7	14
	50.00	50.00	100.00

Statistics for Table of PRENNEZ by GNRH

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Phi Coefficient		0.0000	
Contingency Coefficient		0.0000	
Cramer's V		0.0000	

WARNING: 100% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F)	4
Left-sided Pr<= F	0.7040
Right-sided Pr>= F	0.7040
TableProbability (P)	0.4079 como p = 0.4079 > α = 0.05, entonces no existe
Two-sided Pr<= P	1.0000 diferenciaestadísticasinificativa.

SampleSize = 14

PRESENCIA DE CUERPO LUTEO ACCESORIO EN VAQUILLAS RECEPTORAS DE EMBRION CON APLICACIÓN DE hCG.

Obs	PRENNEZ	GNRH	COUNT
1	SI	GNRH6	5
2	SI	GNRH7	6
3	NO	GNRH6	2
4	NO	GNRH7	1

Table of PRENNEZ by GNRH

PRENNEZ	GNRH		Total
Frequency,			
Percent ,			
Row Pct ,			
Col Pct ,GNRH6 ,GNRH7 ,			
NO	2	1	3
	33.33	16.67	50.00
	66.67	83.33	
SI	5	6	11
	45.45	54.55	90.91
	90.91	90.91	
Total	7	7	14
	50.00	50.00	100.00

NO	2	1	3
	14.29	7.14	21.43
	66.67	33.33	
	28.57	14.29	
SI	5	6	11
	35.71	42.86	78.57
	45.45	54.55	
	71.43	85.71	
Total	7	7	14
	50.00	50.00	100.00

Statistics for Table of PRENNEZ by GNRH

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.4242	0.5148
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.4308	0.5116
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.3939	0.5302
Phi Coefficient		0.1741	
Contingency Coefficient		0.1715	
Cramer's V		0.1741	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F)	2
Left-sided Pr<= F	0.9038
Right-sided Pr>= F	0.5000

TableProbability (P) 0.4038 como $p = 0.4038 > \alpha = 0.05$, entonces no existe
 Two-sided Pr<= P 1.0000 diferencia estadística significativa
 SampleSize = 14

PRESENCIA DE CUERPO LUTEO ACCESORIO EN VAQUILLAS RECEPTORAS DE EMBRION CON APLICACIÓN DE GNRH Y hCG EL DÍA 6 POST-CELO

The SAS System

Obs	PRENNEZ	GNRH	COUNT
1	SI	GNRH6	3
2	SI	GNRH7	5
3	NO	GNRH6	4
4	NO	GNRH7	2

Table of PRENNEZ by GNRH

PRENNEZ	GNRH		Total
Frequency,	GNRH6	GNRH7	
Percent			
Row Pct			
Col Pct			
NO	4	2	6
	28.57	14.29	42.86
	66.67	33.33	
	57.14	28.57	
SI	3	5	8
	21.43	35.71	57.14
	37.50	62.50	
	42.86	71.43	
Total	7	7	14
	50.00	50.00	100.00

Statistics for Table of PRENNEZ by GNRH

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.4242	0.5148
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.4308	0.5116
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.3939	0.5302
Phi Coefficient		0.1741	
Contingency Coefficient		0.1715	
Cramer's V		0.1741	



Chi-Square	1	1.1667	0.2801
Likelihood Ratio Chi-Square	1	1.1849	0.2764
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.2917	0.5892
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	1.0833	0.2980
Phi Coefficient		0.2887	
Contingency Coefficient		0.2774	
Cramer's V		0.2887	

WARNING: 100% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

ffffffffffffffffffffffffffffffff

Cell (1,1) Frequency (F) 4

Left-sided Pr<= F 0.9487

Right-sided Pr>= F 0.2960

TableProbability (P) 0.2448 como $p = 0.2448 > \alpha = 0.05$, entonces no existe

Two-sided Pr <= P 0.5921 no existe diferencia estadística significativa.

SampleSize = 14

PRESENCIA DE CUERPO LUTEO ACCESORIO EN VAQUILLAS RECEPTORAS DE EMBRION CON APLICACIÓN GNRH Y hCG EL DÍA 7 POST PARTO.

The SAS System

Obs	PRENNEZ	GNRH	COUNT
1	SI	GNRH6	3
2	SI	GNRH7	6
3	NO	GNRH6	4
4	NO	GNRH7	1

Table of PRENNEZ by GNRH

PRENNEZ	GNRH		Total
Frequency,			
Percent ,			
Row Pct ,			
Col Pct ,	GNRH6	GNRH7	
NO	4	1	5
	28.57	7.14	35.71
	80.00	20.00	
	57.14	14.29	
SI	3	6	9
	21.43	42.86	64.29
	33.33	66.67	
	42.86	85.71	
Total	7	7	14
	50.00	50.00	100.00

Statistics for Table of PRENNEZ by GNRH

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	2.8000	0.0943
Likelihood Ratio Chi-Square	1	2.9468	0.0860
Continuity Adj. Chi-Square	1	1.2444	0.2646
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	2.6000	0.1069
Phi Coefficient		0.4472	
Contingency Coefficient		0.4082	
Cramer's V		0.4472	

WARNING: 100% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

ffffffffffffffffffffffffffffffff

Cell (1,1) Frequency (F) 4

Left-sided Pr<= F 0.9895

Right-sided $Pr \geq F$ 0.1329

TableProbability (P) 0.1224 como $p = 0.3671 > \alpha = 0.05$, entonces no existe
Two-sided $Pr \leq P$ 0.2657 diferencia estadística significativa.

SampleSize = 14