

Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales

**Jorge Fernando Betancourth
Gabriel Cáceres Gutiérrez**

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2011

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

**Jorge Fernando Betancourth
Gabriel Cáceres Gutiérrez**

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2011

Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales

Presentado por:

Jorge Fernando Betancourth
Gabriel Cáceres Gutiérrez

Aprobado:

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor Principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director Carrera de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Isidro A. Matamoros, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Celia O. Trejo, Ph.D.
Asesor

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Coordinador Área de Zootecnia

RESUMEN

Betancourth, J.F; Cáceres, G. 2011. Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales. Proyecto Especial Programa de Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Tegucigalpa, Honduras. 18 p.

Se utilizaron 10 vacas de las razas Holstein, Pardo Suizo y Jersey divididas en dos grupos de cinco vacas cada uno. Se aplicaron dos protocolos hormonales: Folltropin[®] y Pluset[®]. El porcentaje de superovulación fue mayor ($p<0.05$) con Folltropin[®] (100%) que con Pluset[®] (40%); el número de embriones producidos por vaca fue similar, con valores de 8.6 y 6.5 embriones/vaca para Folltropin[®] y Pluset[®] respectivamente; con respecto al grado de desarrollo, el tratamiento con Pluset[®] produjo el mayor porcentaje ($p<0.05$) de embriones Grado I (61.54%) mientras que Folltropin[®] produjo 25.58%; en el Grado II hubo diferencia ($p<0.05$) siendo el tratamiento con Folltropin[®] el que obtuvo el mayor porcentaje (41.86%) mientras que Pluset[®] presentó 23.08%; en el Grado III y IV los resultados fueron similares con valores de 9.30% y 7.79% para el Grado III y 6.98% y 7.69% para el Grado IV para Folltropin[®] y Pluset[®] respectivamente. El porcentaje de embriones producidos de acuerdo al estadio de desarrollo fue similar para el estadio M con 4.65% y 0.00% para Folltropin[®] y Pluset[®] respectivamente; para el estadio Mt hubo diferencia ($p<0.05$) con valores de 18.60% y 30.77% para Folltropin[®] y Pluset[®] respectivamente; en el estadio B los porcentajes fueron similares con 37.21% y 38.46% para Folltropin[®] y Pluset[®] respectivamente; en el estadio Be hubo diferencia ($p<0.05$) con valores de 9.30% y 23.08% para Folltropin[®] y Pluset[®] respectivamente. El menor costo por embrión producido por vaca se obtuvo con Folltropin[®] con 17.65 usd mientras que con Pluset[®] fue de 22.58 usd. Bajo las condiciones de Zamorano se recomienda la aplicación de Folltropin[®] para la superovulación de vacas lecheras.

Palabras clave: Calidad, Costo, Grado de desarrollo, Folltropin[®], Pluset[®].

CONTENIDO

Portadilla.....	ii
Página de firmas	iii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
6. LITERATURA CITADA.....	15

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Protocolo Folltropin®	5
2. Protocolo Pluset®	6
3. Porcentaje de superovulación y número de embriones producidos por vaca...	10
4. Clasificación de los embriones con base al grado de desarrollo.....	11
5. Clasificación de los embriones con base a estadio de desarrollo.....	11
6. Costo del tratamiento por vaca y por embrión producido por vaca.....	12
Figuras	Página
1. Representación esquemática de una pajueta con un embrión congelado.....	9
Anexos	Página
1. Costos de los materiales utilizados para un procedimiento de superovulación, lavado y recolección de embriones.....	18

1. INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías ganaderas han contribuido en el aumento de la productividad y el desarrollo del sector agropecuario. Con respecto a la reproducción animal, la Inseminación Artificial (IA) ha sido quizás la biotecnología ganadera utilizada en mayor medida, particularmente en combinación con la criopreservación, y ha permitido un mejoramiento genético significativo centrado en la productividad así como la difusión mundial de germoplasma masculino escogido. Tecnologías complementarias como la sincronización del estro y el sexado de semen pueden mejorar la eficacia de la IA (FAO 2010).

La superovulación es el estímulo hormonal del ovario para aumentar el número de folículos producidos durante el estro, por medio de la aplicación de diferentes tipos de hormonas, entre las cuales se destacan la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Gonadotropina del Suero de Yeguas Preñadas (PMSG). Con esto se permite que las hembras con un alto mérito genético tengan un número de crías superior al normal (Vélez *et al.* 2002).

La Transferencia de Embriones (TE) consiste en extraer embriones aun no implantados, del conducto reproductor de la madre donante (madre genética), por perfusión con un medio apropiado, para luego depositarlos en el conducto de una hembra receptora (madre nutricia) de la misma especie, donde se obtiene la gestación a término (Mosquera 1994). Algunas de las ventajas de la transferencia de embriones son: acelerar el progreso genético, aprovechar el potencial de hembras de alta genética, control de enfermedades, acortar el intervalo generacional, intensificar la natalidad por partos dobles, conservación de especies en extinción, formación de nuevas razas con pocos donantes, mezclar genotipos (quimeras), producir gemelos, cuatrillizos (micro manipulación), controlar el sexo de las crías, obtener crías con mayor posibilidades de supervivencia y adaptación, mantener embriones por largo tiempo (conservación), fomentar las ciencias reproductivas entre otras (Mosquera 1994).

Así mismo, la TE presenta desventajas como cualquier proceso biotecnológico. Las desventajas pueden ser: la multiplicación de características indeseables de animales que no son aptos para ser introducidos en un programa de TE, la variabilidad que se presenta en materia de resultados, la poca disponibilidad de hembras receptoras ideales, los altos costos en materia de hormonas para control del ciclo estral y superovulación, personal técnico altamente capacitado para evitar disminuciones en la efectividad de la técnica y la variabilidad en cuanto a la calidad de los embriones (Bó *et al.* 2003).

Según Hincapié y Campo (2001), esta técnica se desarrolló comercialmente en los países desarrollados en la década de los 70s, y hasta el momento se consolida como una de las herramientas más importantes en mejoramiento genético, además es de gran importancia en la introducción de nuevos genotipos, y en la máxima explotación de animales superiores.

Actualmente, en estos países la TE está al alcance de la mayoría de los productores, debido a que su costo no es muy elevado, se cuenta con la tecnología necesaria, y se obtienen grandes beneficios de su uso. En los países subdesarrollados el panorama no es tan favorable, ya que no es una técnica muy conocida, y no se cuenta con los recursos físicos y económicos para su implementación.

La TE se realiza desde hace más de treinta años (Merton *et al.* 2003) y hoy en día es muy utilizada en todo el mundo (Duica *et al.* 2007). El éxito de un programa de TE se mide por el número de terneros que nacen vivos por hembra donante en un determinado lapso de tiempo (Peres *et al.* 2006). Los resultados se ven afectados por una serie de factores inherentes a la donante, al embrión, a la aplicación de la técnica y a las receptoras, quienes reciben un embrión extraño a nivel uterino, permitiendo su desarrollo gestacional (Duica *et al.* 2007; Peres *et al.* 2006).

Dentro de los factores embrionarios, la calidad influye claramente en el resultado de la transferencia, independientemente de que los embriones sean frescos, criopreservados, micromanipulados y/o producidos *in vitro* (Cutini *et al.* 2000a). La congelación afecta la viabilidad de los embriones producidos *in vivo*, no obstante, como las diferencias no son sustanciales se compensan con las ventajas que la técnica trae aparejada. La viabilidad post transferencia de los embriones producidos *in vitro* y micromanipulados es marcadamente inferior a la de los embriones producidos *in vivo*, tales diferencias se acrecientan cuando dichos embriones son criopreservados (Cutini *et al.* 2000a).

Al momento de la transferencia, la receptora ideal es aquella con sincronismo o con un asincronismo de +/- 24 h, en la que se ha comprobado la presencia del CL; además se debe relacionar el estadio de desarrollo embrionario con el día del ciclo de la receptora (Cutini *et al.* 2000b). Las receptoras deben ser reproductivamente sanas para recibir un embrión y llevar la gestación a término, poseer un tamaño que les permita parir sin dificultades y deben ser de buena capacidad lechera para alimentar al ternero de manera que le permita expresar su potencial genético (Irouléguy 2011).

En Zamorano, Soletto (2000) obtuvo una respuesta a la sincronización de celos en vaquillas de doble propósito y de carne de 92% con $\text{PGF}_2\alpha$ y de 97% con progestágeno más PMSG mientras que la embrionización al primer celo fue de 44 y 29% respectivamente. La fertilidad al segundo servicio fue de 45 y 36% con la $\text{PGF}_2\alpha$ y con el progestágeno respectivamente. Quesada (1999) obtuvo una respuesta a la sincronización con progestágeno de 97.1% y de 92.1% con $\text{PGF}_2\alpha$, y alcanzó un 35.5% de preñez con embriones congelados.

Ake López *et al.* (1999) encontraron 6.6 embriones transferibles en vacas con niveles de progesterona plasmática > 3 ng/mL al inicio de la superovulación, mientras que los

animales que tuvieron < 3 ng/mL de progesterona solo produjeron 3 embriones transferibles. Zbylut y Jaskowski (1999) obtuvieron un promedio de 3.0 embriones transferibles en Holstein F1 y 3.23 en donadoras Limousin, ambos grupos tratados con Folltropin. Hernández y Cahua (1998) no encontraron diferencia estadística en el número de embriones transferibles en ganado lechero en el trópico, tratado con 260 mg vs 320 mg de FSH.

Gallegos *et al.* (2003) formaron dos grupos de 18 vacas cada uno de la raza Beefmaster, en el grupo I en el estro previo a la superovulación se sincronizó con $\text{PGF}_2\alpha$ en un programa de doble inyección y se utilizó para la superovulación 24mg de gonadotropina hipofisiaria de origen porcino, obteniendo 6.7 ± 1.6 embriones calidad 1, 1.8 ± 0.73 embriones degenerados. En el grupo II se aplicó un progestágeno por vía intravaginal + una inyección IM de 2.5 mg de benzoato de estradiol un día después de poner el progestágeno, después la superovulación se inició con 22mg de FSH (extracto purificado de pituitarias porcinas) obteniendo: 3.8 ± 1.1 embriones calidad 1, 3.5 ± 0.97 embriones degenerados.

Con base a lo anterior, se realizó un estudio en Zamorano con el objetivo de evaluar la respuesta de vacas lecheras a la superovulación y transferencia de embriones utilizando dos protocolos hormonales; se determinó el porcentaje de superovulación y el número de embriones recolectados para cada uno de los protocolos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó entre julio de 2010 a mayo de 2011 en la unidad de producción intensiva de leche de la EAP Zamorano, localizada a 32 km de Tegucigalpa, con una temperatura promedio anual de 24°C, una precipitación promedio de 1100 mm/año y altura sobre el nivel del mar de 800 m.

Se utilizaron 10 vacas de las razas Holstein, Pardo Suizo y Jersey; todos los animales fueron sometidos a la revisión ginecológica por el Médico Veterinario a fin de determinar su buen estado de salud.

Los criterios de inclusión utilizados fueron:

- Condición corporal ≥ 2.75 y ≤ 4 en la escala de 1 a 5.
- Número de lactancias entre 3 y 5.
- Haber completado el periodo de espera voluntaria de 90 días pos parto.
- No haber presentado durante el periodo del puerperio, algún trastorno como retención de placenta, piómetra, endometritis.
- Presentar un buen historial reproductivo: no más de 2 servicios por concepción, no tener historias de abortos.
- A la palpación rectal, presentar los órganos reproductivos en buen estado, cuernos simétricos, cérvix recto y sobre el piso de la pelvis.

Todos los animales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación:

En la época de lluvia, a los 20 días preparto, las vacas son llevadas a los potreros cercanos al establo alimentándose de pasto Tobiatá (*Panicum maximum*), Trasvala (*Digitaria eriantha*), y Estrella (*Cynodon nlemfluencis*), se les suministra la dieta de transición que consiste en 2.72 kg de concentrado/vaca/día; una vez sucedido el parto, las vacas entran al lote de vacas recién paridas donde son alimentadas con una dieta que consta de 6.81 kg de concentrado/vaca/día hasta completar un mes. Posteriormente, y según los niveles de producción, las vacas son distribuidas en grupos: alta, media y baja producción y la dieta consiste en 0.45 kg de concentrado por litro de leche producido. En la época seca, la alimentación se basa en una ración totalmente mezclada de ensilajes (maíz, o sorgo), heno, concentrado, aditivos y minerales.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos de 5 vacas cada uno, donde cada grupo fue un tratamiento y cada vaca una unidad experimental. Las vacas fueron inseminadas por la misma persona a fin de evitar el efecto inseminador al igual que la condición corporal fue evaluada por la misma persona; se utilizó semen importado de

las razas Holstein, Pardo Suizo o Jersey de acuerdo a la raza de cada donadora y su calidad biológica fue verificada en el laboratorio de reproducción animal de Zamorano;

para efecto del estudio cada vaca fue servida en tres ocasiones durante el celo inducido por la superovulación; el diagnóstico de superovulación se realizó por ultrasonido (Sonovet 600, con sonda lineal de 7.5 MHz). Los protocolos que se utilizaron se presentan en los cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Protocolo Folltropin[®] (donantes: vacas lecheras)

Día	Hora	Descripción/Labor
0	am	CIDR-B + 5 mg BE + 100 mg P ₄ .
4	am	4 mL Folltropin [®] .
	pm	4 mL Folltropin [®] .
5	am	3 mL Folltropin [®] .
	pm	3 mL Folltropin [®] .
6	am	2 mL Folltropin [®] + 25 mg PGF ₂ α (5mL Lutalyse [®]).
	pm	2 mL Folltropin [®] + retirar CIDR-B + 25 mg PGF ₂ α (5mL Lutalyse [®]).
7	am	1 mL Folltropin [®] .
	pm	1 mL Folltropin [®] (observar Celo).
8	am	150μg GnRH (Gonadorelina) IM Chequeo de celo e IA a las 6 horas de iniciado el celo, repetir cada 12 horas hasta completar 3 IA. Utilizar camisa sanitaria en cada IA.
9	am	Inseminación artificial.
15	am	Lavado y recolección de embriones.

Cuadro 2. Protocolo Pluset[®] (donantes: vacas lecheras)

Día	Hora	Descripcion/Labor
0	am	CIDR + 2.5mg BE + 50mg Progesterona IM.
4	am	3.0mL Pluset [®] IM*
	pm	3.0mL Pluset [®] IM*
5	am	2.5mL Pluset [®] IM*
	pm	2.5mL Pluset [®] IM*
6	am	1.5mL Pluset [®] IM + 25 mg PGF ₂ α (5mL Lutalyse [®])
	pm	1.5mL Pluset [®] IM + 25 mg PGF ₂ α (5mL Lutalyse [®]) + Retiro del CIDR
7	am	1.0mL Pluset [®] IM
	pm	1.0mL Pluset IM (observar celo).
8	am	150μg GnRH (Gonadorelina) IM Chequeo de celo e IA a las 6 horas de iniciado el celo, repetir cada 12 horas hasta completar 3 IA. Utilizar camisa sanitaria en cada IA.
9	am	Inseminación artificial.
15	am	Lavado y recolección de embriones.

*IM= intramuscular

A las donadoras se les colocó 25mg de PGF₂α (Dinoprost, Lutalyse[®]) luego del lavado y se repitió a los 11 días.

Se utilizaron como fuentes hormonales: Folltropin[®] equivalente a 400 mg de NIH-FSH-P1 (Laboratorios Bioniche, USA), Pluset[®] equivalente a 500 UI de FSH y 500 UI de LH (Laboratorios Calier, Argentina), Lutalyse[®] (Dinoprost 5mg/mL, Laboratorios Upjohn, USA), CIDR[®] (progesterona 1.38 g/dispositivo, Laboratorios Pfizer, USA), Gestar[®] (gonadorelina 42μg/mL, Laboratorios Over, Argentina), Benzoato de Estradiol[®] (BE 1mg/mL, Laboratorios Syntex, Argentina), Progesterona[®] (progesterona 25mg/mL, Laboratorios Erma, Colombia).

Para la recolección de los embriones se utilizó la metodología del circuito cerrado con flujo discontinuo. Una vez realizado el lavado del útero, se procedió a la búsqueda de los embriones, para lo cual se realizó el siguiente protocolo:

- Dejar reposar el colector mínimo 5-10 minutos a 37°C.
- Placa de búsqueda con fondo cuadrulado.
- Lavar el filtro (75μm) con medio de lavado.
- Lupa estereoscopio o microscopio con 10-20X (diámetro del embrión 120-150μ, zona pelúcida 12-15μ).
- Utilizar microcapilares Unopette o micropipetas especiales para la manipulación.
- Revisar cada placa dos veces.

- Mover la placa para evitar que se peguen a los bordes.
- El medio de lavado que se utilizó fue el Bioniche Complete Flush[®] a razón de 500mL por cuerno uterino.

A medida que los embriones fueron localizados, se depositaron en placas nunc de 4 pozos conteniendo medio de mantenimiento (Bioniche[®]) a 37°C, se lavaron y se retiraron los *detritus*, a medida que se fueron pasando de un pozo a otro, se fueron clasificando, para lo cual se utilizó la nomenclatura recomendada por Palma y Brem (1993):

- Mórula temprana (Mt). Entre el día 5-6 aproximadamente, con 32-64 blastómeros. Sus blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa el 60-70% del espacio perivitelino. La compactación es considerada como uno de los signos de diferenciación embrionaria, aunque los blastómeros conserven su capacidad totipotente.
- Blastocito temprano (Bt). Alrededor del día 7 con 100-200 células. Se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación de una cavidad (blastocele) en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo de sello. El Bt ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna.
- Blastocisto (B). Del día 7-8, con 100-200 células. Existe una marcada diferenciación entre las células del trofoblasto, que constituyen una pared –que se adosa a la zona pelúcida- y la masa celular interna (o disco embrionario) más oscura.
- Blastocisto expandido (Be). Del día 7-8 con más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida a 1/3 de su espesor original. La presión creciente del blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su protrusión. Los embriones recuperados en este estadio se pueden colapsar temporalmente, esto se caracteriza por una pérdida completa o parcial del blastocele.
- Blastocisto protruido (Bp). Del día 8-9 con 200-800 células. Los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocele bien definido o colapsado (burbuja). La identificación en este estadio puede ser dificultosa para el inexperto operador. Los Bp pueden ser igualmente transferidos, sin embargo, los embriones desprovistos de la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos, razón por la cual se acostumbra a transferir estadios de Mt a Be.

La determinación del grado de calidad del embrión permite caracterizar en términos (más o menos) cuantitativos las posibilidades de desarrollo y posterior nacimiento de un ternero

a partir del embrión obtenido. Los diferentes grados de calidad fueron determinados por medio del microscopio (0.7-6.4x). Tanto la observación *per se* como la diferenciación entre un grado y otro es subjetiva y depende en gran parte de la experiencia del operador.

G I: Excelente, el desarrollo corresponde al día de la recolección. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniformes, simétricos, de forma esferoide y la zona pelúcida está intacta.

G II: Bueno, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de *detritus* celulares. Su forma puede ser ligeramente irregular.

G III: Regular, el embrión posee varios defectos: *detritus* celulares, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida.

G IV: Malo, el embrión posee muchos defectos: los correspondientes al G III más desarrollo retardado, sería ruptura de la zona pelúcida –el embrión puede encontrarse parcialmente fuera de ella-, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o vacuolización de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y la clara degeneración. Esta categoría es considerada como no transferible.

Kuzan (1988), adicionó otras dos categorías:

G V: Totalmente degenerados.

G VI: Ovocitos sin fertilizar o las zonas pelúcidas vacías.

Una vez clasificados los embriones fueron congelados los GI y GII. La preparación de las pajuelas de 0.25mL se realizó con medio de mantenimiento y etilenglicol como se indica en la Figura 1.

Se determinaron las siguientes variables para cada tratamiento:

- Porcentaje de vacas que superovularon.
- Número de embriones producidos.
- Porcentaje de embriones producidos de acuerdo al grado y estadio de desarrollo.
- Costo del tratamiento y del embrión.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento. Los valores porcentuales de superovulación y porcentaje de embriones producidos de acuerdo al estado y al grado fueron analizados por la prueba de Chi-cuadrado (χ^2); el número de embriones producidos se analizó por medio del análisis de varianza (ANDEVA) y separación de medias. El paquete estadístico fue el Statistical Analysis System (SAS 2009) y el nivel de significancia exigido fue de ≤ 0.05 .

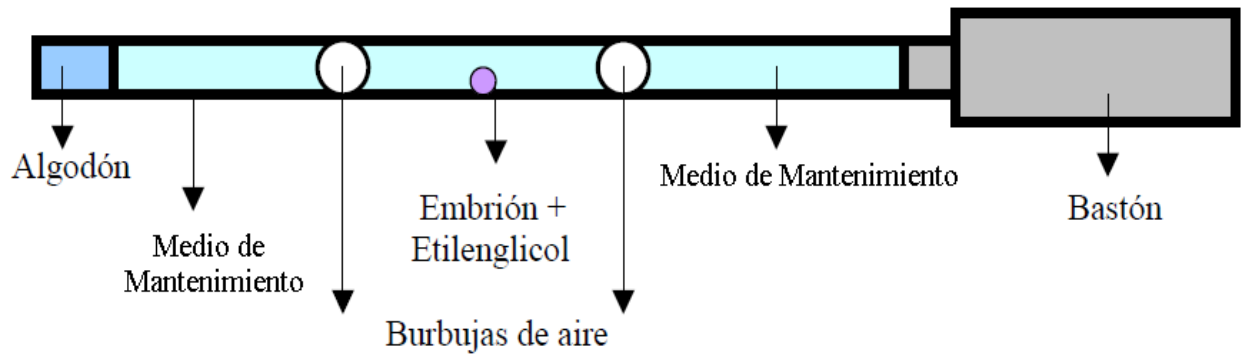


Figura 1. Representación esquemática de una pajuela con un embrión congelado (Görlach 1997).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PORCENTAJE DE SUPEROVULACIÓN Y NÚMERO DE EMBRIONES POR VACA

Las diferencias fueron significativas entre los tratamientos en porcentaje de superovulación obteniendo los mejores resultados con Folltropin[®] superando a Pluset[®] en un 60% (Cuadro 3). Estos resultados son similares a los encontrados por Mejía y Vásquez (2002) quienes obtuvieron una respuesta superovulatoria del 100% utilizando Folltropin[®] en la evaluación de la técnica de transferencia de embriones bajo las condiciones de Zamorano. Por otra parte no se encontró diferencias significativas en el número de embriones producidos por vaca (Cuadro 3). Estos resultados superan a los encontrados por Mejía y Vásquez (2002) quienes obtuvieron 5.6 embriones recolectados por vaca utilizando Folltropin[®].

Cuadro 3. Porcentaje de superovulación y número de embriones producidos por vaca.

Tratamiento	% de superovulación	N° de embriones/vaca
Folltropin [®]	100 ^a	8.6
Pluset [®]	40 ^b	6.5
P	0.0384	0.1251
CV		18.4503

a, b =Valores en la misma columna con distinta letra difieren entre sí (P≤0.05)

P= Probabilidad

CV= Coeficiente de Variación

PORCENTAJE DE EMBRIONES PRODUCIDOS DE ACUERDO AL GRADO DE DESARROLLO

Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos entre los embriones de grado I y grado II de desarrollo (Cuadro 4), obteniendo los mejores resultados con Pluset[®] en embriones grado I, superando a Folltropin[®] en un 35.96%, sin embargo, Folltropin[®] superó a Pluset[®] en un 18.78% en embriones grado II. No se obtuvo diferencia significativa en embriones grado III y IV entre los tratamientos. Estos resultados superan los de Kelly *et al.* (1997) quienes reportaron el 45.08% de sus embriones en grado I y II utilizando Folltropin[®] ya que este estudio logró 67.44% de los embriones en grado I y II, por otro lado son similares a los datos obtenidos por Mejía y Vásquez (2002) quienes obtuvieron 64.7% de embriones grado I y II.

Cuadro 4. Clasificación de los embriones con base al grado de desarrollo.

Tratamiento	%			
	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
Folltropin [®]	25.58 ^a	41.86 ^a	9.30	6.98
Pluset [®]	61.54 ^b	23.08 ^b	7.69	7.69
P	<0.0001	0.0061	0.69	0.8444

a, b =Valores en la misma columna con distinta letra difieren entre sí (P≤0.05)

P= Probabilidad

PORCENTAJE DE EMBRIONES PRODUCIDOS DE ACUERDO AL ESTADIO DE DESARROLLO

Las diferencias fueron significativas entre los tratamientos en los estadios de desarrollo Mt y Be, obteniendo los mejores resultados con Pluset[®] en los estadios Mt y Be superando a Folltropin[®] en 12.17% y 13.78% respectivamente (Cuadro 5). No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos en los estadios de desarrollo M y B. Según Curtis (2009), los embriones buenos para fines de TE comercial normalmente son los embriones en estadio de Mórula (M), Blastocisto Temprano (Bt), Blastocisto expandido (Be) y preferiblemente Blastocisto (B). Un embrión en estadio de Mórula temprana (Mt) no debe ser congelado. Sin embargo, se pueden lograr buenos resultados con una Mórula temprana (Mt) cuando se le transfiere fresca a una receptora en el sexto día de celo. Los embriones buenos son los que producen tasas de preñez promedio al ser congelados o transferidos frescos. Las tasas de preñez promedio son 65% para transferencia en estado fresco y 55% para embriones congelados/descongelados. Schneider *et al.* (1980) obtuvieron porcentajes de preñez de 61%, 67%, 67% y 71% con embriones en estadios de desarrollo Mt, Mc, Bt, y Be respectivamente. Se observó una tendencia creciente en la tasa de gestación a medida que avanza el desarrollo del embrión. Una posible explicación para ello sería que las mórulas tempranas se encontraron retardadas en su desarrollo de acuerdo al momento de la recolección al 6to y 8to días de recolección (Elsden *et al.* 1978; Hasler *et al.* 1987). Una segunda explicación posible es que los defectos morfológicos son más fáciles de observar en estadios embrionarios avanzados (Halley *et al.* 1979).

Cuadro 5. Clasificación de los embriones con base a estadios de desarrollo.

Tratamiento	Estadio (%)			
	M	Mt	B	Be
Folltropin [®]	4.65	18.60 ^a	37.21	9.30 ^a
Pluset [®]	0.00	30.77 ^b	38.46	23.08 ^b
P	0.0766	0.0362	0.855	0.0033

a, b =Valores en la misma columna con distinta letra difieren entre sí (P≤0.05)

P= Probabilidad.

M= Mórula.

Mt= Mórula temprana.

B= Blastocisto.

Be= Blastocisto expandido.

COSTO DEL TRATAMIENTO POR VACA Y POR EMBRIÓN PRODUCIDO POR VACA

Los costos totales del tratamiento por vaca fueron mayores con el tratamiento Folltropin® (Cuadro 6), teniendo una diferencia de \$5.00 más que el tratamiento Pluset®. Sin embargo, el costo por embrión producido por vaca es mayor en el tratamiento Pluset® teniendo una diferencia de \$38.80 más que el tratamiento Folltropin®, esto se debe a que el tratamiento Folltropin® presentó mayor número de embriones por vaca. En el Anexo 1 se presentan desglosados los costos de cada uno de los tratamientos.

Cuadro 6. Costo del tratamiento por vaca y por embrión producido por vaca (USD).

Tratamiento	Costo Trt/vaca	Costo Total/Trt	Total e/Trt	Costo e/vaca
Folltropin®	151.77	758.85	43.00	17.65
Pluset®	146.77	733.85	13.00	56.45

Trt=Tratamiento.

e=Embrión.

Tasa de cambio 1USD=18.89 L.

4. CONCLUSIONES

- El mayor porcentaje de superovulación y número de embriones por vaca se obtuvo con el tratamiento con Folltropin[®].
- El mayor porcentaje de embriones grado I se obtuvo con Pluset[®], sin embargo, con Folltropin[®] se obtuvo el mayor porcentaje de embriones grado II; el porcentaje de embriones grado III y IV fue similar entre Pluset[®] y Folltropin[®].
- El porcentaje de embriones en estadio de Blastocisto fue similar entre Folltropin[®] y Pluset[®], sin embargo, Pluset[®] presentó un mayor porcentaje de embriones en Mórula temprana y Blastocisto expandido.
- El menor costo por embrión producido por vaca se obtuvo con el tratamiento con Folltropin[®].

5. RECOMENDACIONES

- Bajo las condiciones de Zamorano se recomienda la utilización de Folltropin[®] para la superovulación de vacas lecheras.
- Se recomienda realizar futuros estudios de ambos tratamientos, Folltropin[®] y Pluset[®] para comparar las respuestas de los mismos con otras hormonas.
- Realizar futuros estudios con un número mayor de vacas.

6. LITERATURA CITADA

Ake López, R; Alfaro Gamboa, ME; Aguayo Arce, AM; Holy, L. 1999. Plasma progesterone concentrations and embryo production in cows superovulated under tropical conditions. *Veterinaria México*. 30:19-23.

Bó, G.; Moreno, D.; Cuaita, L.; Caccia, M. 2003. Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones. IV Seminario Internacional de Reproducción de Grandes Animales. CGR. Bogotá, Colombia s.p.

Curtis, J.L. 2009. Procedimiento de transferencia de embriones en bovinos. Academic Press, Inc. Manhattan, E.E.U.U. pp. 30-31.

Cutini, A.; Teruel, M.; Cabodevila, J. 2000a. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Revista Taurus* 7:28-39.

Cutini, A.; Teruel, M.; Cabodevila, J. 2000b. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Revista Taurus* 8:35-47.

Duica, A.; Tovio, N.; Grajales, H. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*. 14:107-124.

Elsden, R.P; Nelson, L.D; Seidel, G.E. 1978. Superovulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*. 9:17-26.

FAO. 2010. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). Conferencia Técnica Internacional de la FAO; Biotecnologías Agrícolas en los Países en Desarrollo: Opciones y oportunidades en los sectores agrícola, forestal, ganadero, pesquero y agroindustrial para hacer frente a los desafíos de la inseguridad alimentaria el cambio climático. Guadalajara, México 1-4 de Marzo de 2010. Consultado en Noviembre de 2010. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/meeting/019/al264s.pdf>.

Gallegos, H.; Martínez, C.; Cervantes, V.; Saucedo, Q. 2003. Comparación de dos métodos de superovulación en vacas donadoras Beefmaster; Calidad Embrionaria. XXVII Congreso Nacional de Buiatría. Asociación Mexicana de médicos veterinarios especialistas en bovinos A.C. Consultado en Noviembre de 2010. Disponible en http://ammveb.net/XXVII%20CNB/memorias/Reproduccion/Oral/htm/Trabajo_61_Comparacion_de_dos_metodos_de_superovulacion.htm.

Görlach, A. 1997. Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Zaragoza, España, Ed. ACRIBIA S.A. 115 p.

Halley, S.M; Rhodes, R.C; Mckellar, L.D; Randel, R.D. 1979. Successful superovulation, nonsurgical collection and transfer of embryos from Brahman cows. *Theriogenology*. 12:97-108.

Hasler, J.F; Mccuailey, A.D; Lathrop, W.F; Foote, R.H. 1987. Effect of donor- embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*. 27:139-168.

Hernandez, F.; Cahua, E. 1998. Superovulatory response and progesterone profiles in tropical dairy criollo cows. *Revista Científica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia*. 8: 94-97 (Suppl. 1).

Hincapié, J.J.; Campo, E.C. 2001. Técnicas para mejorar la eficiencia reproductiva en animales de granja. Tegucigalpa, Honduras, Ed. Prografic. 222 p.

Irouléguy, J. M. 2011. Transferencia de embriones a tiempo fijo: Algunas variables que afectan la tasa de preñez. Tesina de la Orientación de Producción Bovinos de Carne, presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Diciembre 2009. Tandil, Buenos Aires, Argentina. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/genetica/articulos/tasa-de-prenez-en-vacas-t3280/103-p0.htm>

Kelly, P.; Duffy, P.; Roche, J.F.; Boland, M.P. 1997. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science*. (EE:UU.) 46:1-14.

Kuzan, F. 1988. Classification of embryos prior to freezing In: Elsdon, R.; Seidel, G., Procedures for recovery, bisection, freezing, and transfer of bovine embryos. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin* 2:34-35.

Mejía, R.; Vasquez, C. 2002. Evaluación de la técnica de transferencia de embriones bajo las condiciones de Zamorano. Tesis Ing. Agr. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. pp. 8-11.

Merton, J. S.; de Roos, A.P.W.; Mullaart, E.; Ruigh, L.; Kaal L.; Vos, P.L.A.M. and Dieleman, S.J. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in comercial applications of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59:651-674.

Mosquera, J. 1994. Transferencia de embriones para la optimización reproductiva de la cría lechera. Trabajos seleccionados sobre producción lechera en la sierra Ecuatoriana;

Proyecto Andino de sanidad agropecuaria. Oficina del IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura) Ecuador. s.p.

Palma, G. A.; Brem, G. 1993. Transferencia de embriones y biotecnologías de la reproducción en la especie bovina. Ed. Hemisferio Sur. Argentina. 503 p.

Peres, L. C.; Pincinato, D.; Cutaia, L.; Bó, G.A. 2006. Simplificación de los programas de transferencia de embriones a tiempo fijo en rodeos comerciales. Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos. IRAC (Instituto de Reproducción Animal Córdoba. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. s.p.

Quesada, V. 1999. Transferencia de embriones AFS (Australian Friesian Sahiwal) en vaquillas, sincronizadas con progestágeno y prostaglandina. Tesis Ing. Agr. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 26 p.

Soletto, R. 2000. Sincronización de celos para inseminación artificial y transferencia de embriones en vaquillas de carne y doble propósito. Tesis Ing. Agr. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 25 p.

SAS[®]. 2009. User's Guide. Statistical Analysis System Inc., Carry, NC, USA. Version 9.01.

Schneider, H.J; Casteberry, R.S; Griffin, J.L. 1980. Commercial aspects of bovine transfer. *Theriogenology* 13: 73-85.

Vélez, M.; Hincapié, J.J.; Matamoros, I; Santillán, R. 2002. Producción de ganado lechero en el trópico. 4° ed. Tegucigalpa, Honduras, Ed. Zamorano Academic Press. 326 p.

Zbylut, J; Jaskowski, J. 1999. Efficacy of superovulation induced by Folltropin-V in cows. *Zycie Weterynaryjne*.74:96-98.

ANEXOS

Anexo 1. Costo de los materiales utilizados para un procedimiento de superovulación, lavado y recolección de embriones (USD).

Materiales Protocolo Folltropin®	Costo \$
Folltropin® (frasco)	92.00
Bioniche Flush Medium (1 litro)	22.00
Emcare Holding Solution (1 bolsa x 6 mL)	3.50
Mini flush/minute filter (1 unidad)	14.00
Agtech Y tubing (1 unidad)	4.95
Silicone Catheter 26" x 30 cc balloon (1 unidad)	12.50
Placa de 4 pozos (1 unidad)	2.00
Pajuela para embrión	0.24
Sealing plug (1 unidad)	0.58
Costo Total	151.77

Tasa de cambio 1USD= 18.89 L.

Materiales Protocolo Pluset®	Costo \$
Pluset® (frasco)	87.00
Bioniche Flush Medium (1 litro)	22.00
Emcare Holding Solution (1 bolsa x 6 mL)	3.50
Mini flush/minute filter (1 unidad)	14.00
Agtech Y tubing (1 unidad)	4.95
Silicone Catheter 26" x 30 cc balloon (1 unidad)	12.50
Placa de 4 pozos (1 unidad)	2.00
Pajuela para embrión	0.24
Sealing plug (1 unidad)	0.58
Costo Total	146.77

Tasa de cambio 1USD= 18.89 L.