

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA,
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**EFFECTO DE DOS PROTOCOLOS DE
SUPEROVULACIÓN EN CANTIDAD Y CALIDAD DE
EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VIVO***

**AUTOR : Bach. Romel Gilberto Aguilar Valqui
ASESOR 1 : Ms. C. Nilton Luis Murga Valderrama
ASESOR 2 : PhD. Manuel Emilio Milla Pino**

CHACHAPOYAS – PERU

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA,
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**EFFECTO DE DOS PROTOCOLOS DE
SUPEROVULACIÓN EN CANTIDAD Y CALIDAD DE
EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VIVO***

**AUTOR : Bach. Romel Gilberto Aguilar Valqui
ASESOR 1 : Ms. C. Nilton Luis Murga Valderrama
ASESOR 2 : PhD. Manuel Emilio Milla Pino**

CHACHAPOYAS – PERU

2019

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico a mis amados padres y hermanas quienes con sus palabras de aliento no me dejaban decaer para seguir a delante y siempre ser perseverante con fin de lograr mis metas. A mis amigos y compañeros, quienes sin esperar nada a cambio me acompañaron y compartieron su conocimiento, logrando así que esta meta se haga realidad

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a Dios quien siempre guía mi vida, dirigiéndome por el camino correcto.

A mis docentes de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

A mis compañeros y amigos(as), quienes de una u otra manera contribuyeron a culminar este trabajo.

A mis Asesores Ms. C. Nilton Luis Murga Valderrama y PhD. Manuel Emilio Milla Pino por ser mis guías en esta etapa, por su disciplina, paciencia dedicada hacia mi persona, sugerencias y observaciones emitidas para el logro del objetivo de esta investigación.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO
RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

Rector

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GUBILLÓN

Vicerrector Académico

Dra. FLOR TERESA GARCIA HUAMÁN

Vicerrectora de Investigación

Ph.D. ILSE SILVIA CAYO COLCA

Decana de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología

VISTO BUENO DEL ASESOR

El docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza – Amazonas, quien suscribe hace constar que ha asesorado el proyecto y la realización de la tesis titulada **“EFECTO DE DOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN EN CANTIDAD Y CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VIVO*”**, presentada por el Bach. Romel Gilberto Aguilar Valqui, egresado de la facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología, de la Escuela Profesional Ingeniería Zootecnista.

Se da el visto bueno al informe final de la tesis mencionada.

Chachapoyas, 11 de febrero del 2019

Ms.C. Nilton Luis Murga Valderrama
Docente de la UNTRM

JURADO EVALUADOR

Ms.C. WIGOBERTO ALVARADO CHUQUI

Presidente

Dr. RAUL RABANAL OYARCE

Secretario

Ing. CESAR MARAVI CARMEN

Vocal

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo, Romel Gilberto Aguilar Valqui identificado con DNI 71406983 estudiante de la escuela profesional de Ingeniería Zootecnista de la facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:
2. Efecto de dos Protocolos de Superovulación en Cantidad y Calidad de Embriones Producidos *In Vivo*.
3. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
4. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros
5. La tesis no ha ido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional
6. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificadas, ni duplicados, ni copiados

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda la responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piraterías, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas, 11 de febrero de 2019

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS

Secretaría General
OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS

ANEXO 3-N

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 05 de febrero del año 2019, siendo las 16:00 horas, el aspirante Romel Gilberto Aguirre Velazco

defiende en sesión pública la Tesis titulada: "Efecto de dos protocolos de Superovulación en Cantidad y Calidad de embriones bovinos producidos in vivo"

para obtener el Título Profesional de Ingeniero Zootecnista,

a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Wigberto Alvarado Olajui

Secretario: Raúl Rabanal Oyarte

Vocal: César Augusto Mavari Carmen



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 17:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ÍNDICE

	Pág.
Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Autoridades de la UNTRM	v
Visto bueno del Asesor de Tesis	vi
Jurado Evaluador	vii
Declaración jurada de no plagio	viii
Acta de Evaluación de la Sustentación de la Tesis	ix
Índice	x
Índice de Tablas	xi
Índice de Figuras	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODO	3
2.1 Materiales y equipos utilizados	3
2.2 Diseño de Investigación	5
2.3 Población, muestra y muestreo	5
2.4 Métodos	5
2.5 Técnicas e instrumentos	6
III. RESULTADOS	12
IV. DISCUSIONES	15
V. CONCLUSIONES	17
VI. RECOMENDACIONES	18
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ANEXOS	21

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<i>Tabla 1.</i> Materiales para superovulación e inseminación	3
<i>Tabla 2.</i> Materiales para colecta de embriones	3
<i>Tabla 3.</i> Materiales para búsqueda y clasificación de embriones	4
<i>Tabla 4.</i> Protocolo de superovulación uno	6
<i>Tabla 5.</i> Protocolo de superovulación dos	7
<i>Tabla 6.</i> Clasificación de los embriones según Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS)	9
<i>Tabla 7.</i> Matriz de información.	12
<i>Tabla 8.</i> Combinaciones evaluadas	13
<i>Tabla 9.</i> Resultados Prueba de Kruskal-Wallis para combinaciones.	13
<i>Tabla 10.</i> Resultados Prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon Para Protocolos	14
<i>Tabla 11.</i> Resultados Prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon Para Razas	14

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Obtención y clasificación de embriones	11
<i>Figura 2.</i> Clasificación de calidad embrionaria observados en la investigación	11

RESUMEN

La investigación se desarrolló en el fundo Santa Elena, Bagua Grande, Perú; se evaluó el efecto de dos protocolos de superovulación en cantidad y calidad de embriones bovinos producidos *in vivo*, con ocho vacas de razas Simmental y Brangus con edades de 18 a 25 meses, en base a hormonas con implante de Dispositivo Intravaginal Bovino (DIB 0.5 mg) + Benzoato de estradiol (BE) + (FSH), (± 1 día) + Prostaglandina (PF2 α) + GnRH. Las donadoras se dividieron en dos grupos de cuatro, a las que se administrarán los protocolos, para el grupo uno se inició la aplicación el día tres y para el grupo dos el día cuatro. La primera colecta se realizó los días 14 y 15; 47 días posteriores se realizó la segunda colecta, invirtiendo la aplicación de los protocolos. No se encontró diferencia significativa ($p \geq 0.10$) con Prueba kruskal-wallis y la Prueba Suma de Rangos de Wilcoxon para el protocolo uno (T1) y protocolo dos (T2) en estructuras embrionarias, Además la raza Brangus produjo mayor número de (NEV), (NED) y (ONF) con respecto a la raza Simmental en ambos protocolos ($p \geq 0.10$).

Palabras claves: Colecta embriones, Hormonas, Reclutamiento.

ABSTRACT

The research was carried out in the Santa Elena farm, Bagua Grande, Peru; the effect of two protocols of superovulation on quantity and quality of bovine embryos produced in vivo was evaluated, with eight cows of Simmental and Brangus breeds aged 18 to 25 months, based on hormones implanted with Bovine Intravaginal Device (DIB 0.5 mg) + Estradiol benzoate (BE) + (FSH), (± 1 day) + Prostaglandin (PF2 α) + GnRH. The donors were divided into two groups of four, to which the protocols will be administered, for group one the application was started on day three and for group two it was four days. The first collection was made on days 14 and 15; 47 days later the second collection was made, reversing the application of the protocols. No significant difference ($p \geq 0.10$) was found with the Kruskal-wallis Test and the Wilcoxon Sum Sum Test for protocol one (T1) and protocol two (T2) in embryonic structures. In addition, the Brangus breed produced the highest number of (NEV), (NED) and (ONF) with respect to the Simmental race in both protocols ($p \geq 0.10$)

Key Words: Embryo Collection, Hormones, Recruitment.

I. INTRODUCCIÓN

El limitado aprovechamiento de los recursos genéticos de hembras bovinas de alto potencial productivo y reproductivo, es una limitante para mejorar la productividad de la ganadería. Uno de los procesos biotecnológicos implementados para superar dicha situación es la superovulación, usando protocolos que permiten obtener embriones viables para realizar transferencia alcanzando animales elites. Así mismo se sabe que de una vaca se obtiene de 6 a 8 crías como promedio en toda su vida reproductiva, efectivizando este tipo de técnicas se puede lograr hasta 100 crías, el precio de la aplicación de estos procesos son costosos pero se justifican al obtener mayor número de embriones con carácter genético puro, propias de la raza y así poder sustentar gastos que se realiza en cada protocolo de superovulación.

En el área de reproducción, se intenta destacar genéticamente las mejores características de los bovinos para poder duplicarlas en una ganadería (Calva *et al.*, y Cevenini, 2001). Una ayuda importante para lograr este objetivo, es incursionar en los tratamientos de superovulación por protocolos en vacas, con el propósito de obtener un mayor número de embriones transferibles que resulten con una buena expectativa de preñez Garzón *et al.*, (2007).

En los últimos décadas en la industria pecuaria, es cada vez más común el uso de protocolos de superovulación una de las biotecnologías reproductivas más usadas. Sin embargo, aún no se logra disminuir el efecto negativo generado por el manejo de los animales por causa de la corta duración de la hormona FSH (aproximadamente 5 a 12 horas) (Driancourt, 2001). Es preciso realizar varias aplicaciones intramusculares para conseguir el efecto de súperovulación en las hembras bovinas Ireland *et al.*, (2007). Por lo cual, los protocolos más comunes requieren seis a ocho aplicaciones de FSH propia de un protocolo de superovulación con intervalos en las horas de administración, con el fin de que varios folículos se desarrollen y pueda ocurrir una ovulación múltiple, para permitir mayor obtención de embriones en la colecta (Lindner y Wright, 1983).

En los últimos años, las biotecnologías aplicadas a la reproducción en ganado bovino, han evolucionado de manera progresiva en nuestro país. El uso de la transferencia de embriones se está incrementado, permitiendo obtener mayor número de ovocitos, por

ende mayor probabilidad de embriones por cada hembra donante, para ser implantada a receptoras seleccionadas, esto ayuda a aumentar la capacidad reproductiva y mejoramiento genético del ganado bovino en menor tiempo. (Córdova, 2011).

Los conocimientos que tenemos del ciclo estral (de la ovulación y dinámica folicular, etc.), nos ayudan a comprender y establecer métodos claves de sincronización del celo, así como tratamientos de superovulación aumentando el número fisiológico de óvulos. (Córdova, 2011).

En condiciones normales, cada vaca produce una cría al año, lo cual significa que cuando mucho producirá seis a ocho crías durante su vida reproductiva. Con la inseminación artificial se pueden obtener miles de crías de un toro; con la transferencia de embriones se puede superar cien crías por vaca durante su vida productiva, lo cual acelera el mejoramiento genético, mejorando la producción de carne y leche (Córdova, 2011).

Los protocolos de superovulación que se usan para sincronizar la emergencia de la onda folicular se emplea comúnmente el estradiol (E2) y los dispositivos de liberación de progesterona (P4), entre otros componentes hormonales (Baruselli *et al.*, 2006).

El objetivo de los tratamientos súper ovulatorios en el bovino, es obtener el máximo número de embriones transferibles que resultaran en la mayor cantidad de terneros posibles, desafortunadamente la producción de embriones en animales súperovulados es muy variable por los diversos factores que se presentan (Becaluba, 2007).

En este contexto el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de dos protocolos de superovulación en cantidad y calidad de embriones bovinos producidos in vivo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y equipos utilizados

-Para el programa de superovulación e inseminación se emplearon lo siguiente.

Tabla 1. Materiales para superovulación e inseminación

Estrovet (Benzoato de Estradiol)
Ciclase (Prostaglandina)
Pluset / (FSH)
Conceptace (GnRH –Gonadotropina)
Dispositivo Intravaginal Bovino (DIB - 0.5 mg)
Tijeras
Jeringas de 5ml y agujas desechables
Pajillas de Semen Bovino
Pistola de Inseminación
Fundas Para Inseminar
Aplicador de DIB
Agua temperada a 37 °C
Guante de obstétricos veterinarios

-En la colecta de embriones se utilizaron lo siguiente.

Tabla 2. Materiales para colecta de embriones

Medio de Colecta
Equipo Y
Filtros
Catéter Folley
Dilatador de cérvix
Estilete o Mandril
Suero fisiológico
Guante de obstétricos veterinarios
Jeringas y agujas desechables
Baño maría
Lidocaína 2%

-En la búsqueda y clasificación de embriones se emplearon lo siguiente.

Tabla 3. Materiales para Búsqueda y clasificación de embriones

Placas Petri de 100mm

Placas Petri de 35mm

Suero fisiológico

Medio de lavado

Hollding®

Etilenglicol®

Micropipeta

Estereoscopio de luz blanca

Platinas térmicas de estereoscopio

Taque criogénico de 20 L

Pajillas de 0.25

Alcohol 1L

Papel Toalla

Marcador

2.2 Diseño de investigación

Se aplicó la “Prueba kruskal-wallis”, con la finalidad de que al culminar el ensayo los dos tratamientos serán aplicados a la misma unidad experimental (Muestras dependientes).

2.3 Población, muestra y muestreo

Población

El universo de la población está conformada por 16 vacas de ganado bovino, de la raza Simmental y Brangus del fundo Santa Elena en la provincia de Bagua-Región Amazonas.

Muestra

Está definida por ocho vacas de la raza Simmental y Brangus, donadoras (hembras vacías, cíclicas) del fundo Santa Elena.

Muestreo

Se seleccionaron al azar ocho vacas de las muestras, cuatro de la raza Simmental y cuatro de la raza Brangus los cuales serán divididos en grupos de cuatro para la aplicación de los protocolos, para posteriormente invertir los tratamientos en cada grupo.

2.4 Métodos

Se utilizó el método inductivo, para evaluar el efecto del protocolo de súperovulación y el método analítico para evaluar la cantidad y calidad de embriones recolectados en la colecta de embriones.

2.5 Técnicas e instrumentos

El presente trabajo de investigación conto con tres fases:

Fase I: Evaluación de donadoras

Se evaluó los siguientes aspectos:

- Se evaluó la condición corporal de las donadoras con un rango mayor a 2.75 y menor igual a 4 (Gómez, 2005)
- Estructuras sanitarias sano (Aspron, 1992).
- Estructura del aparato reproductor, ovarios funcionales ciclando (Gómez, 2005)

Fase II: Implementación del protocolo de superovulación para donadoras

En el protocolo uno de superovulación se empleó implante dispositivo intravaginal bovino (DIB) con un contenido de 0.5 mg de progesterona (P4) + BE (Benzoato de estradiol) + la aplicación de la hormona folículo estimulante (FSH) con variación de un día en la aplicación de esta + Prostaglandina (PF2 α) y Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), la cual se describe (Tabla 4).

Tabla 4. Protocolo de superovulación uno

Día Protocolo	Mañana (6am.)	Tarde (6pm.)
día 0	Colocar DIB + 0.8 ml BE	
día 1		
día 2		
día 3	4.0 ml FSH	4.0 ml FSH
día 4	3 ml FSH	3 ml FSH
día 5	2 ml FSH	2 ml FSH + 3 ml Pg
día 6	1 ml FSH	1 ml FSH + retirar DIB
día 7	9:00 am (GnRH) 3.5 ml	6:00 pm. IA
día 8	6:00 am IA	
día 9		
día 10		
día 11		
día 12		
día 13		
día 14	Colecta, búsqueda, evaluación y selección de embriones	

Fuente: Protocolo Modificado de Superovulación manual IETS 2011.

En el protocolo dos, de superovulación se empleó implante dispositivo intravaginal bovino (DIB) con un contenido de 0.5 mg de progesterona (P4) + Benzoato de estradiol (BE) + la aplicación de la hormona folículo estimulante (FSH) con variación de un día en la aplicación de esta y Prostaglandina (PF2 α) y Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), la cual se describe (Tabla 5).

Tabla 5. Protocolo de súperovulación dos

Día Protocolo	Mañana (6am.)	Tarde (6pm.)
día 0	Colocar DIB + 0.8 ml BE	
día 1		
día 2		
día 3		
día 4	4.0ml FSH	4.0ml FSH
día 5	3ml FSH	3ml FSH
día 6	2ml FSH	2ml FSH + 3 ml Pg
día 7	1ml FSH	1ml FSH + retirar DIB
día 8	9:00 am GnRH 3.5 ml	6:00 pm. IA
día 9	6:00 am IA	
día 10		
día 11		
día 12		
día 13		
día 14		
día 15	Colecta, búsqueda, evaluación y selección de embriones	

Fuente: Protocolo de Superovulación manual IETS 2011.

Fase III: colecta de embriones y su clasificación

El procedimiento que se siguió para la colecta y clasificación de los embriones será según (Robertson, 2015); que fue de la siguiente manera:

1. Limpieza de la vaca: se realizó manualmente la evacuación de toda la bosta que se halla en el recto para luego realizar un lavado de toda la parte perianal, posteriormente se realiza un secado total de toda esta zona.
2. Evaluación de ovarios (derecho izquierdo): mediante palpación rectal se determina el número de cuerpos lúteos por cada ovario para saber la respuesta ovárica y tener una idea del número de estructuras (ovocitos y embriones) a colectar.
3. Aplicación de anestesia: se aplicará anestesia (lidocaína al 2% genérica) epidural de 4 a 6 ml.
4. Instalación del medio de colecta: que constará de 1 litro de medio de colecta (Agtech), filtro y equipo “Y” (circuito cerrado con flujo discontinuo, sonda de dos vías), todo esto se instala en la parte lateral posterior derecho a la vaca, estando el medio de 60 a 90 cm por encima de la grupa de la vaca.
5. Dilatación se Cérvix: con la ayuda de un dilatador cervical (varilla de acero inoxidable de 0.6 cm de diámetro x 60 cm de largo) se realiza pasaje de cérvix con la finalidad de dilatar y facilitar el pasaje del catéter Foley.
6. Fijación del catéter Foley: con la ayuda de un mandril (varilla de acero inoxidable de 0.2 cm x 70 cm de largo) que es introducido al catéter Foley con la finalidad de dar rigidez a este para su fácil pasaje vía cervical hasta el cuerno derecho donde es fijado mediante el inflado del balón con aire (12 – 16 cm³), lavado este cuerno uterino se repite la acción con el lado izquierdo.
7. Lavado de los cuernos o colecta de embriones: se realizó con ayuda de suaves masajes próximos a la unión útero tubárica, utilizando medio litro de medio de colecta de embriones por cuerno que es introducido por partes al cuerno uterino y extraído el cual llega al filtro donde son retenidas las estructuras (ovocitos y

embriones); acabado el proceso de colecta de los dos cuernos el filtro es llevado al laboratorio para su lavado.

8. Lavado de filtro: el filtro es llevado al laboratorio para su lavado el cual se realiza vaciando todo su contenido a una o dos caja Petri de 100 mm, se ayuda el lavado con aplicación de medio de colecta a presión mediante una jeringa de 20 ml sin embolo de jebe y con aguja calibre 21 G., esta repetición.
9. Búsqueda y clasificación de embriones se realizó mediante un estereoscopio (Nikon MZ 745 - Alemán), a un aumento de 20X se realiza una búsqueda y todas las estructuras halladas son trasladadas a una caja Petri de 35 mm la cual contiene medio de mantenimiento (Holding no refrigerado de Bioniche) para posteriormente acabada la búsqueda realizar la clasificación de todas las estructuras halladas.

Para la clasificación de estructuras se tiene en consideración lo que norma la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones IETS; siendo la que se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de los embriones según Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS)

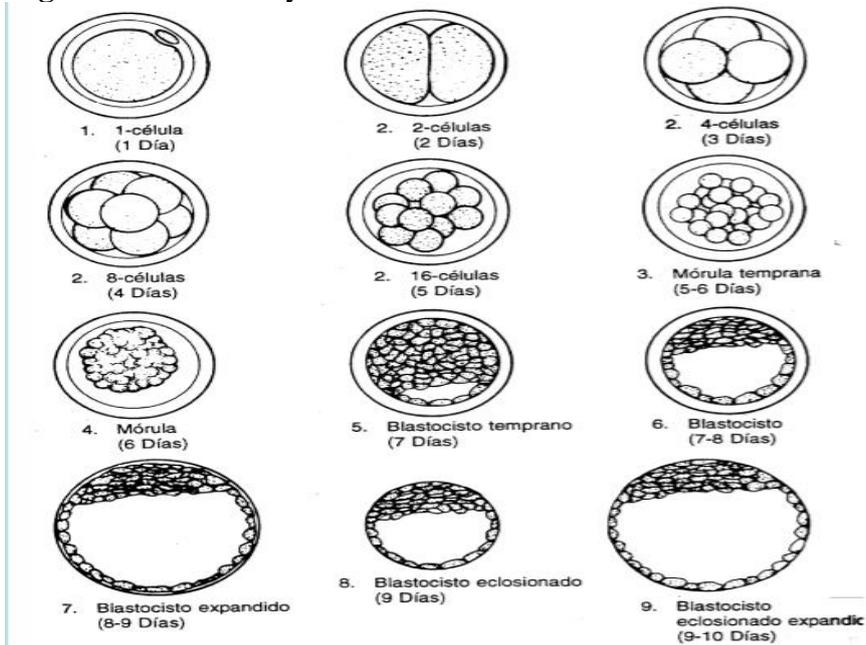
Estadio		Calidad	
Denominación	Valoración	Denominación	Valoración
Ovocito no fertilizado-UFO	1	Excelente	1
Mórula compacta	4	Bueno	2
Blastocisto temprano	5	Regular	3
Blastocisto	6	Degenerado	4
Blastocisto expandido	7		
Blastocisto eclosionado	8		

Fuente: Manual IETS 2011

Los estadios que se tuvieron en cuenta en la presente investigación son óvulos no fecundados mórula y blastocito, éste último indistintamente sin su clasificación. En cuanto a la calidad se tendrán en cuenta la calidad excelente, buena y regular; teniendo en cuenta que la calidad excelente presenta blastómeros visibles, color y estructura uniforme esferoide buena compactación y zona pelúcida intacta, extrusión máximo 15% (transferible). La calidad buena presenta pocos blastómeros desprendidos de la masa celular, detritus celular, forma irregular, poca compactación, extrusión máxima 50% (transferible). La calidad regular presenta un color oscuro o muy claro, forma irregular, detritus celular, desarrollo retardado, zona pelúcida agrietada, extrusión máxima 75% (transferible). Y la calidad mala aspecto degenerado, vacuolización de blastómeros, aspecto granuloso estados de 8 células (no transferible).

- En la siguiente figura se observa la obtención y clasificación de los embriones.

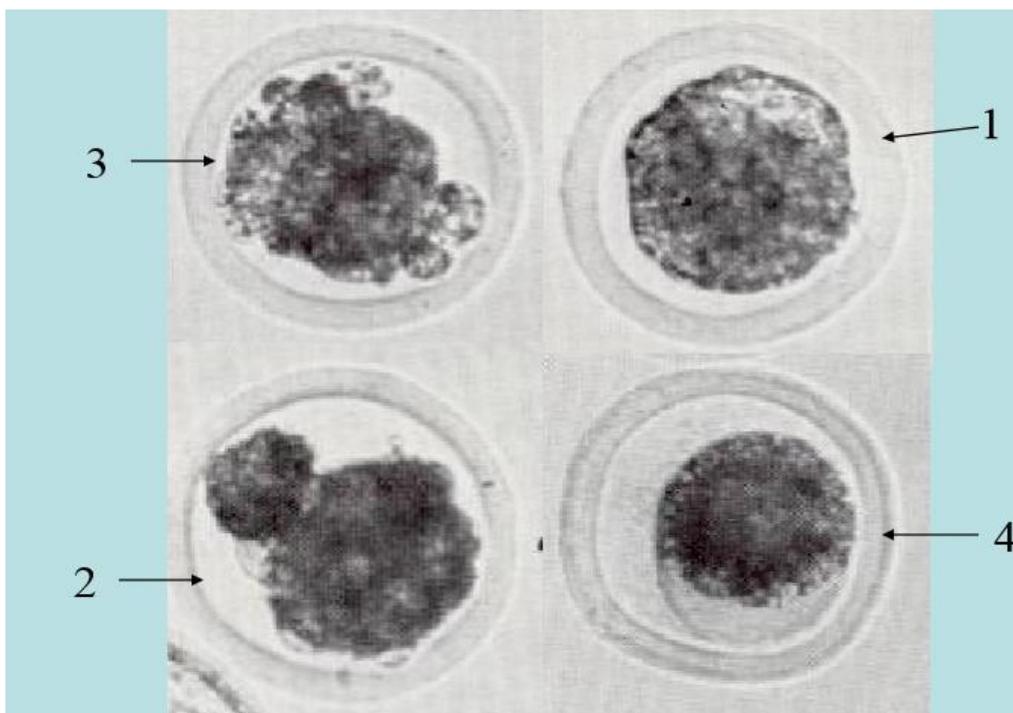
Figura 1. Obtención y clasificación de embriones



Fuente: Manual IETS 2011

- En la siguiente figura se observa la clasificación por calidad de embrionaria

Figura 2. Clasificación de calidad embrionaria observados en la investigación



Fuente: Manual IETS 2011

III. RESULTADOS

En la tabla matriz de datos se muestra los siguientes resultados:

- Protocolo (Tratamiento = 1 y 2)
- Raza = 1 y 2
- Vacas = 1, 2, 3, 4
- Combinaciones = 1, 2, 3,4

Tabla 7. Matriz de información.

TRATAMIEN	RAZA	VACAS	COMBINACI	NEV	NED	ONF
1	1	1	1	1	0	0
1	1	2	1	1	0	0
1	1	3	1	0	0	0
1	1	4	1	0	0	0
1	2	1	2	2	0	0
1	2	2	2	5	0	5
1	2	3	2	21	0	0
1	2	4	2	0	0	0
2	1	1	3	0	1	3
2	1	2	3	4	2	5
2	1	3	3	0	0	0
2	1	4	3	0	0	0
2	2	1	4	15	0	16
2	2	2	4	0	0	0
2	2	3	4	5	0	6
2	2	4	4	4	0	11

NEV: Número de Embriones Viables NED: Número de Embriones Degenerados
ONF: Ovulo no Fecundado.

- En virtud de que los datos fueron generados a partir de conteos y que el número de repeticiones es pequeño, se ha decidido trabajar con un nivel de significancia (α) igual a 0.10., A continuación se muestra en la (Tabla 7), las combinaciones evaluadas de la matriz de datos de la (Tabla 8). Donde la combinación 1 es el protocolo 1 aplicado a la raza Simmental, combinación 2 es protocolo 1 aplicado a la raza brangus, la combinación 3 es el protocolo 2 aplicado a la raza Simmental y la combinación 4 es el protocolo 2 aplicado a la raza Brangus.

- Las combinaciones evaluadas son:

Tabla 8. Combinaciones evaluadas

COMBINACIÓN	TRATAMIENTO / RAZA
1	T ₁ R ₁
2	T ₁ R ₂
3	T ₂ R ₁
4	T ₂ R ₂

- Cuadros de resúmenes de los resultados
 - En cuanto a la variable NÚMERO DE EMBRIONES VIABLES (NEV), no se encontró diferencias significativas entre las combinaciones, sin embargo, se observa que la raza Brangus es la que genera mayor cantidad de embriones viables para los dos protocolos estudiados (Tabla 9).
 - Con respecto a la variable NÚMERO DE EMBRIONES DEGENERADOS (NED), se encontró diferencias significativas entre las combinaciones, siendo la COMBINACIÓN 3, es decir, protocolo 2 (4 días) aplicado a la raza Simmental, la que presenta mayor cantidad de embriones degenerados (Tabla 9).
 - En relación a la variable ÓVULOS NO FECUNDADOS (ONF), se detectaron diferencias significativas entre las combinaciones, siendo la COMBINACIÓN 4, es decir, protocolo 2 (4 días) aplicado a la raza Brangus, la que presenta mayor cantidad de óvulos no fecundados (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados Prueba de Kruskal-Wallis para combinaciones

variable	kruskal-wallis		combinación	
	estadístico	p-valor	mayor valor	menor valor
número de embriones viables (nev)	4.6075 ns	0.2029	2, 4	1, 3
número de embriones degenerados (ned)	6.4000 *	0.0937	3	1, 2, 4
óvulos no fecundados (onf)	6.4421 *	0.092	4	1, 2, 3

ns: no significativo *: significativo **: altamente significativo

En las variables número de embriones viables (NEV) y número de embriones degenerados (NED) no se aprecian diferencias significativas entre los protocolos, pero se observa que el protocolo dos (2), aplicado el día cuatro, es el que genera la mayor cantidad de óvulos no fecundados (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados Prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon Para Protocolos

Variable	Estadístico Wilcoxon		Protocolo	
	Aproximación normal	p-valor	Mayor valor	Menor valor
Número de embriones viables (nev)	0.000 ns	1	iguales	
Número de embriones degenerados (ned)	1.369 ns	0.1709	iguales	
Óvulos no fecundados (onf)	1.993 *	0.0462	2	1

ns: no significativo *: significativo **: altamente significativo

En las variables número de embriones degenerados (NED) y óvulos no fecundados (ONF) no se aprecian diferencias significativas entre las razas, pero se observa que la raza dos, la raza Brangus, es la que genera la mayor cantidad de embriones viables (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados Prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon Para Razas

Variable	Estadístico wilcoxon		Raza	
	aproximación normal	p-valor	mayor valor	menor valor
Número de embriones viables (nev)	2.088 *	0.0368	2	1
Número de embriones degenerados (ned)	1.369 ns	0.1709	iguales	
Óvulos no fecundados (onf)	1.329 ns	0.1839	iguales	

ns: no significativo *: significativo **: altamente significativo

IV. DISCUSIONES

- Fernández (2014) realizó una investigación sobre “producción de embriones in vivo en tres razas de ganado lechero” encontrando que la respuesta de la raza Simmental a dos protocolos de superovulación fue en promedio 3.6 ± 0.8 embriones viables por vaca, siendo ligeramente superior a los resultados encontrados en esta investigación (02 embriones viables para el protocolo uno y 04 para el protocolo dos, en raza Simmental). Brenes (2014) reportó embriones totales de $(16,7 \pm 9,5)$ en promedio de la raza Brangus, siendo similar al promedio de 11.25 de embriones viables (NEV), embriones degenerados (NED) y óvulos no fecundados (OFN), en la raza Brangus..
- Brenes, C. (2014), en el trabajo de investigación titulada “Biotecnologías reproductivas en bovinos, sincronización y transferencia de embriones in vivo” concluyo que: al realizar la colecta de embriones en la raza Brangus, obtuvo en promedio de ovocitos/embriones totales de $(16,7 \pm 9,5)$, usando un protocolo similar que se plasma en esta investigación, mientras que nosotros obtuvimos un promedio de 11.25 de embriones viables (NEV), embriones degenerados (NED) y óvulos no fecundados (OFN), todo esto también evaluado en la raza Brangus.
- La producción embrionaria fue menor en la raza Simmental para ambos protocolos, esto podría estar relacionado con el ambiente en que se encontró, pues el estrés calórico tiene un efecto directo sobre la respuesta superovulatoria, lo que indica un efecto negativo sobre la viabilidad embrionaria. Al respecto, (Córdova, 2011) menciona que la respuesta superovulatoria en animales Bos Indicus tiene mayor promedio de embriones recuperados y embriones viables por donadora que los animales de la raza Bos Taurus en condiciones tropicales. De igual manera (Palma, 2001) afirma que la raza Bos Indicus responde con mayor número de embriones viables, que las razas Bos Taurus pertenecientes a zonas frías.

- Referente al número de embriones viables (NEV), no se evidencia diferencia significativa ($p \geq 0.10$) entre los protocolos; sin embargo, la raza Brangus generó la mayor cantidad de estructuras para ambos protocolos respecto a la Simmental. Al respecto Baruselli et al. (2016) menciona que las razas Bos indicus son sensible a los protocolos para realizar trabajos de superovulación, por lo cual indicaría mayor número de embriones viables, embriones degenerados, óvulos no fecundados, entre otros.
- En cuanto a número de embriones degenerados (NED), obtenidos por los protocolos para ambas razas se encontró un total de tres (03), resultados aún menores, comunicado por Salgado *et al.*, (2011), quien obtuvo una proporción de embriones degenerados de donadoras de la raza Brahmán con una promedio mayor o igual a 5.
- Con respecto a número de óvulos no fecundados (ONF), se encontró diferencia significativa entre ambos protocolos para ambas razas, representando el 45.79% del total estructuras en las colectas, acercándose a los resultados de Fernández, E. (2014) quien obtuvo un total de 47.2% de estructuras, de óvulos no fertilizados, degenerados y embriones de baja calidad que fueron todos estos obtenidos de donadoras de las razas Holstein, Brown Swiss y Fleckvieh, aplicando protocolo de superovulación.

V. CONCLUSIONES

- En la raza Simmental en cuanto a la cantidad de estructuras, resultado del protocolo número uno aplicado el día tres, se obtuvo dos (02) estructuras, versus al protocolo dos aplicado el día cuatro donde se obtuvo (15) estructuras y con respecto a la calidad embrionaria se encontró dos (02) embriones viables, cero (0) degenerados y cero (0) ONF, para el protocolo uno, así mismo con la aplicación del protocolo dos se encontró en estructuras, cuatro (04) embriones viables, tres (03) degenerados y ocho (08) ONF. En número de embriones viables no se observa diferencia significativa para ambos protocolos.
- En la raza Brangus en cuanto a la cantidad de estructuras, resultado del protocolo número uno aplicado el día tres, se obtuvo (33) estructuras, versus al protocolo dos aplicado el día cuatro donde se obtuvo (57) estructuras y en relación a la calidad embrionaria se encontró 28 embriones viables, cero (0) degenerados y cinco (5) ONF, para el protocolo uno, así mismo con la aplicación del protocolo dos se encontró en estructuras, 24 embriones viables, cero (0) degenerados y 33 ONF. En número de embriones viables no se observa diferencia significativa para ambos protocolos.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con investigaciones de aplicación de los protocolos con diferentes razas de vacas donadoras.
- Se recomienda utilizar el protocolo número uno, quien a pesar de no tener diferencia significativa con el protocolo dos, se disminuye un día en la coleta.
- Por los resultados obtenidos en la presente investigación aunque no hay diferencia significativa en número de embriones viables, se recomienda el uso del protocolo uno donde se obtiene menor NED y menor número de ONF.
- Se recomienda que la raza Simmental se evalúe en condiciones ambientales propias de la raza, para así obtener una mejor respuesta embrionaria con protocolos de superovulación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aspron, P. (1999). *La tecnología de transferencia directa de embriones*. The World's source for bovine genetics.
- Baruselli, P. S., de Sá Filho, M. F., Martins, C. M., Nasser, L. F., Nogueira, M. F., Barros, C. M., & Bó, G. A. (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65(1), 77-88.
- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación en bovino. www.produccion-animal.com.ar.
- Brenes, C. (2014). *Biotecnologías reproductivas en bovinos, sincronización y transferencia de embriones in vivo realizada en el Instituto de Reproducción* (Tesis de pregrado). Animal, Córdoba, Argentina, pp. 34.
- Calva, B., Cortés, R., Aja, S., Ortiz, F. & Cevenini, G. (2001). La Transferencia de embriones. Una técnica de mejoramiento animal en ganado de lidia. *Cirugía y Cirujanos*, 129-134.
- Córdova, A. (2011). *Protocolos de Sincronización y Superovulación para Transferencia de Embriones en Bovinos* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cuenca. Ecuador.
- Córdova, A. (2011). *Protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones bovinos* (Tesis de pregrado). MVZ. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Driancourt, M. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: Implications for manipulation of reproduction, *Theriogenology*, 55, 1211-1239.
- Fernández, E. (2014). *Producción de embriones in vivo en tres razas de ganado lechero* (Tesis de pregrado). Lima, Perú.
- Garzón, N., Urrego, R. & Giraldo, C. (2007). Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2), 68-77.

- Gómez, C. (2005). Transferencia de embriones experiencias en Colombia. Memorias, congreso internacional de reproducción bovina. *INTERVET*. Bogotá. Colombia.
- I.E.T.S. (2011). Manual de la sociedad internacional de transferencia de embriones. Una guía de procedimientos e información general sobre el uso de tecnología para la transferencia de embriones que enfatiza sobre los procedimientos sanitarios. 2011. Cuarta Edición. *International Embryo Transfer Society*. USA.57-58, 155-158p.
- Ireland, J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J., Smith, G., Lonergan, P. (2007). Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*, 22(6), 1687–1695.
- Lindner, G. y Wright, R. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation, *Theriogenology*, 20, 407-416,
- Palma G.A. 2001. Biotecnología de la reproducción. *Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, Argentina, pp. 705.
- Robertson, E. (2015). Embryo collection and transfer. En: *Bovine reproduction, 1a ed.* 2015. Sección III, capítulo 76 (103-717).
- Salgado, R., Mejía, A., Suárez, P. (2011). Efficiency of superovulatory response to P-24 protocol in fixed time embryo transfer in Brahman cattle. *REVISTA MVZ CÓRDOBA*. Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Colombia.

ANEXOS

PANEL FOTOGRAFICO

Selección de Donadoras



Fotografía 1: Selección



Fotografía 2: Selección



Fotografía 3: Selección



Fotografía 4: Selección

Procesos de la aplicación de los protocolos



Fotografía 5: Implantación del DIB



Fotografía 6: Implantación del DIB



Fotografía 7: Implantación del DIB



Fotografía 8: Aplicación de hormonas



Fotografía 9: IATF



Fotografía 10: IATF

Colecta de embriones



Fotografía 11: Colecta



Fotografía 12: Colecta

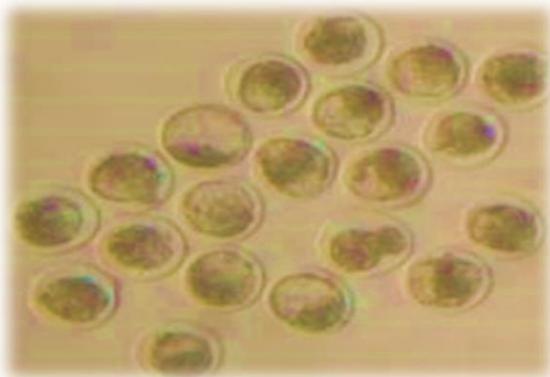
Búsqueda y selección de embriones



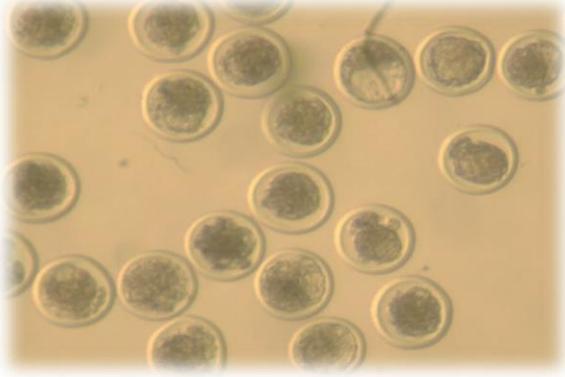
Fotografía 13: Selección de embriones



Fotografía 14: Selección de embriones



Fotografía 13: Selección



Fotografía 14: Selección

Empajillado de embriones



Fotografía 15: Empajillado



Fotografía 16: Empajillado

PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS PARA COMBINACIONES

Statistix 8.0
10:46:51 p. m.

03/01/2019,

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for NEV by COMBINACI

COMBINACI	Mean Rank	Sample Size
1	6.3	4
2	10.9	4
3	5.9	4
4	11.0	4
Total	8.5	16

Kruskal-Wallis Statistic 4.6075
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.2029

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	95.375	31.7917	1.77	0.2057
Within	12	215.125	17.9271		
Total	15	310.500			

Total number of values that were tied 13
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 16 Missing Cases 0

Statistix 8.0
10:47:49 p. m.

03/01/2019,

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for NED by COMBINACI

COMBINACI	Mean Rank	Sample Size
1	7.5	4
2	7.5	4
3	11.5	4
4	7.5	4
Total	8.5	16

Kruskal-Wallis Statistic 6.4000
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0937

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	48.000	16.0000	2.98	0.0741
Within	12	64.500	5.3750		
Total	15	112.500			

Total number of values that were tied 14
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 16 Missing Cases 0

Statistix 8.0
10:49:42 p. m.

03/01/2019,

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for ONF by COMBINACI

COMBINACI	Mean Rank	Sample Size
1	5.5	4
2	7.3	4
3	8.6	4
4	12.6	4
Total	8.5	16

Kruskal-Wallis Statistic 6.4421
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0920

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	110.375	36.7917	3.01	0.0721
Within	12	146.625	12.2188		
Total	15	257.000			

Total number of values that were tied 12
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 16 Missing Cases 0

PRUEBA DE SUMA DE RANGOS DE WILCOXON PARA TRATAMIENTOS

Statistix 8.0
10:59:41 p. m.

03/01/2019,

Wilcoxon Rank Sum Test for NEV by TRATAMIEN

TRATAMIEN	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	68.500	8	32.500	8.6
2	67.500	8	31.500	8.4
Total	136.00	16		

Exact Permutation Test Two-tailed P-value 0.9946

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 0.000
Two-tailed P-value for Normal Approximation 1.0000

Total number of values that were tied 13
Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 16 Missing Cases 0

Wilcoxon Rank Sum Test for NED by TRATAMIEN

TRATAMIEN	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	60.000	8	24.000	7.5
2	76.000	8	40.000	9.5
Total	136.00	16		

Exact Permutation Test Two-tailed P-value 0.4667

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 1.369
 Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.1709

Total number of values that were tied 14
 Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 16 Missing Cases 0

Wilcoxon Rank Sum Test for ONF by TRATAMIEN

TRATAMIEN	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	51.000	8	15.000	6.4
2	85.000	8	49.000	10.6
Total	136.00	16		

Exact Permutation Test Two-tailed P-value 0.0629

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 1.993
 Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0462

Total number of values that were tied 12
 Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 16 Missing Cases 0

PRUEBA DE SUMA DE RANGOS DE WILCOXON PARA RAZAS

Statistix 8.0 03/01/2019,
 11:10:25 p. m.

Wilcoxon Rank Sum Test for NEV by RAZA

RAZA	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	48.500	8	12.500	6.1
2	87.500	8	51.500	10.9
Total	136.00	16		

Exact Permutation Test Two-tailed P-value 0.0329

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 2.088
 Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0368

Total number of values that were tied 13
 Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 16 Missing Cases 0

Wilcoxon Rank Sum Test for NED by RAZA

RAZA	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	76.000	8	40.000	9.5
2	60.000	8	24.000	7.5
Total	136.00	16		

Exact Permutation Test Two-tailed P-value 0.4667

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 1.369
 Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.1709

Total number of values that were tied 14
 Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 16 Missing Cases 0

Wilcoxon Rank Sum Test for ONF by RAZA

RAZA	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	56.500	8	20.500	7.1
2	79.500	8	43.500	9.9
Total	136.00	16		

Exact Permutation Test Two-tailed P-value 0.1841

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 1.329
 Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.1839

Total number of values that were tied 12
 Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 16 Missing Cases 0