

# Evaluación de factores que afectan la fertilidad de la receptora de embriones de genotipo Holstein mestiza

## Evaluation of factors that affect the fertility of the recipient of crossbred Holstein genotype embryos

María Gabriela Fariás-Delgado<sup>1,2</sup> , Luis Eduardo Ayala-Guanga<sup>3\*</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias Veterinarias. Ecuador.

<sup>2</sup>Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Extensión Chone, Carrera Agropecuaria. Ecuador.

<sup>3</sup>Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria. Ecuador.

\*Autor para correspondencia: [luis.ayala@ucuenca.edu.ec](mailto:luis.ayala@ucuenca.edu.ec)

### RESUMEN

El estudio determinó el efecto del tamaño del Cuerpo Lúteo (CL), la concentración de Progesterona ( $P_4$ ), el tiempo empleado en pasar el cérvix, el lugar de depósito del embrión y el tiempo total requerido para cumplir con el proceso de transferencia del embrión (TE) sobre la tasa de preñez (TP) de vaquillas Holstein ( $n=40$ ). Previo a la transferencia, las receptoras fueron ecografiadas y las que presentaron  $CL > 15$  mm ingresaron al experimento. Se transfirieron 40 embriones congelados-descongelados de calidad 1 (excelentes), obteniendo una TP del 45%. El tamaño del CL y la concentración de  $P_4$  de las vaquillas gestantes ( $20,6 \pm 0,31$  mm;  $4,4 \pm 0,12$  ng·mL<sup>-1</sup>) fueron mayores al de las no gestantes ( $16,7 \pm 0,28$  mm;  $3,1 \pm 0,11$  ng·mL<sup>-1</sup>;  $P < 0,05$ ). El tiempo requerido para pasar el cérvix fue mayor en las vacías que en las gestantes ( $60,0 \pm 5,32$  s;  $40,3 \pm 4,65$  s, respectivamente); así como el tiempo total empleado en la TE fue mayor en las vaquillas no gestantes ( $783,0 \pm 31,43$  s) comparado con las gestantes ( $680,9 \pm 29,93$  s;  $P < 0,05$ ). Se estableció una correlación alta y positiva entre el tamaño del CL y la concentración de  $P_4$  con la preñez ( $r=0,84$ ;  $r=0,77$ ;  $P < 0,001$ , respectivamente). Sin embargo, la correlación observada entre el tiempo utilizado para pasar el cérvix ( $r=0,35$ ;  $P < 0,05$ ) y el tiempo total empleado en transferir el embrión con la preñez fue positiva, pero baja ( $r=0,45$ ;  $P < 0,05$ ). Se concluye que un  $CL > 20$  mm en el momento de la transferencia proporcionó mayor concentración de  $P_4$ , factor que incrementa la probabilidad de establecer una gestación. Además, cuanto menos tiempo se requiera para pasar el cérvix, el embrión pudo ser depositado con menor manipulación en el tercio craneal del cuerno uterino, disminuyendo el tiempo total empleado en la transferencia del embrión, lo cual incrementó la tasa de concepción.

**Palabras clave:** Vaquillas; Holstein; embriones; congelados; gestación

### ABSTRACT

The study determined the effect of the size of the Corpus Luteum (CL), the concentration of Progesterone ( $P_4$ ), time needed to pass the cervix, the place of deposit of the embryo and the total time required to complete the embryo transfer process (TE) on the pregnancy rate (PR) of Holstein heifers ( $n=40$ ). Prior to the transfer, the recipients were ultrasounded and those with  $CL > 15$  mm entered the experiment. Forty quality 1 (excellent) frozen-thawed embryos were transferred, obtaining a TR of 45%. The CL size and  $P_4$  concentration of pregnant heifers ( $20.6 \pm 0.31$  mm;  $4.4 \pm 0.12$  ng·mL<sup>-1</sup>) were greater than that of non-pregnant heifers ( $16.7 \pm 0.28$  mm;  $3.1 \pm 0.11$  ng·mL<sup>-1</sup>;  $P < 0.05$ ). The time required to pass the cervix was greater in non-pregnant heifers than in pregnant ( $60.0 \pm 5.32$  s;  $40.3 \pm 4.65$  s, respectively); as well as the total time spent in ET was greater in non-pregnant heifers ( $783.0 \pm 31.43$  s) compared to pregnant heifers ( $680.9 \pm 29.93$  s;  $P < 0.05$ ). A high and positive correlation was established between CL size and  $P_4$  concentration with pregnancy ( $r=0.84$ ;  $r=0.77$ ;  $P < 0.001$ , respectively). However, the correlation observed between the time used to pass the cervix ( $r=0.35$ ;  $P < 0.05$ ) and the total time spent transferring the embryo with the pregnancy was positive, but low ( $r=0.45$ ;  $P < 0.05$ ). It concludes that a  $CL > 20$  mm at the time of transfer provided a higher concentration of  $P_4$ , a factor that increases the probability of establishing a pregnancy. Furthermore, the less time required to pass the cervix, the embryo could be deposited with less manipulation in the cranial third of the uterine horn, decreasing the total time spent transferring the embryo, which increased the conception rate.

**Key words:** Heifers; Holstein; embryos; frozen; gestation

## INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) es una técnica empleada para mejorar el rendimiento reproductivo y aumentar el número de animales con alto mérito genético dentro de las ganaderías [1]. La mejora continua de esta biotécnica ha permitido transferir embriones producidos *in vivo* e *in vitro* [2], ya sean frescos o congelados-descongelados [3].

A pesar de los avances que han convertido a la TE en un procedimiento rutinario en varias explotaciones ganaderas a nivel mundial [4], la variación de la tasa de preñez continúa siendo un problema [5], pues varios factores afectan el establecimiento de la gestación [6], lo cual incrementa el costo de aplicación y reduce la posibilidad de usar esta técnica en ganaderías de países en desarrollo [7].

La supervivencia embrionaria luego de la criopreservación [8], es un factor a considerar al momento de elegir transferir embriones frescos o congelados-descongelados, ya que estos últimos ven reducido en un 10 % la tasa de preñez en comparación con embriones frescos [9].

La  $P_4$  es una hormona importante en la implantación del embrión al mejorar el ambiente uterino, en este aspecto se ha descrito que el diámetro del CL está íntimamente relacionado con la cantidad de  $P_4$  que se produce [10]; por ejemplo, un CL de 15 mm secreta  $1,22 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $P_4$ , mientras que un CL de 16 mm llega a duplicar esa cantidad ( $2,48 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) [11]. Además, se ha determinado una relación positiva entre el porcentaje de preñez y el tamaño del CL, indicando que a medida que aumenta el diámetro del CL, el porcentaje de preñez se incrementa [12]. Sin embargo, existen otros trabajos que al valorar receptoras Holstein mestizas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) llegaron a establecer que el tamaño del CL no influyó en el porcentaje de preñez [13, 14].

Existe evidencia científica que determina que el grado de dificultad para atravesar el cérvix es otro factor que influye sobre el porcentaje de preñez; así, en novillas Nelore se estableció que, a mayor tiempo requerido para salvar el cérvix, menor es la tasa de preñez [15, 16]. Sin embargo, hay trabajos que se contraponen indicando que el tiempo requerido para el paso del cérvix no influye significativamente sobre el porcentaje de preñez [7].

Además, el lugar del cuerno uterino donde se deposita el embrión (craneal, medio o caudal) influye sobre la tasa de preñez [17], llegando a determinar que los embriones depositados en el tercio craneal presentaron 9 puntos porcentuales más (69 %) que aquellos depositados en el tercio (60 %) caudal [18]. Sin embargo, se ha descrito que es preferible depositar el embrión en el tercio medio (48 %), pues colocar el mismo en la parte craneal requiere de mayor manipulación, lo cual puede causar laceración del cuerno uterino provocando secreción de Prostaglandinas, hormona que podría producir lisis del CL y reducir la tasa de preñez (20 %) [19].

Por último, Roper y col. [17] describieron que el tiempo total necesario para completar la transferencia influye en el porcentaje de preñez, determinando que el proceso debería completarse en menos de 9 min para que no se vea disminuida la tasa de concepción. Por lo tanto, el estudio determinó el efecto del tamaño del CL, la concentración de  $P_4$ , el tiempo empleado en pasar el cérvix, lugar de depósito del embrión y el tiempo total requerido para cumplir con el proceso de transferencia del embrión sobre la tasa de preñez en vaquillas Holstein mestizas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales y granja

La investigación se realizó en la granja experimental de Nero, perteneciente a la Universidad de Cuenca, Ecuador, ubicada a 3.100 metros sobre el nivel del mar (msnm), en el trópico alto del Ecuador. Se seleccionaron 40 vaquillas Holstein mestizas con peso promedio de  $381 \pm 19,85 \text{ kg}$  y una condición corporal (CC) de  $3,1 \pm 0,25$  en escala de 1-5, de acuerdo a lo determinado por Hoedemaker y col. [20]. Edad de  $20,8 \pm 2,03$  meses. Los animales recibieron una alimentación basada en pastoreo. Antes del inicio del experimento se realizó un diagnóstico ecográfico (Aloka ProSound 2<sup>o</sup>, Tokyo-Japón) del aparato reproductivo de los animales. Las vaquillas seleccionadas fueron determinadas cíclicas, con un CL > 15 mm, con una morfología cervical adecuada que permitió el paso del dispositivo de TE (determinado al pasar la pistola de transferencia a través de su cérvix), y la ausencia de patologías en el tracto reproductivo [21]. Durante la realización del estudio se tuvo presente la normativa del código sanitario para animales terrestres, capítulo 7,8 "Utilización de animales en la investigación y educación", de la Organización Mundial de Sanidad Animal [22].

### Diseño experimental

La investigación fue de tipo experimental y valoró como influye el tamaño del CL, la concentración de  $P_4$ , el tiempo requerido para pasar el cérvix, el lugar de depósito del embrión y el tiempo total empleado para realizar el procedimiento de transferencia del embrión sobre la tasa de preñez.

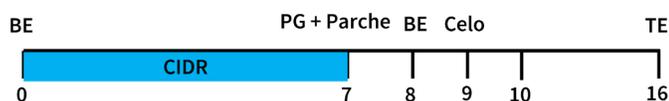
### Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados y procesados en el programa informático Excel<sup>®</sup> y analizados en el programa estadístico SPSS versión 25<sup>o</sup>. Se realizaron estadígrafos principales de todas las variables. Se determinó que los datos presentaron normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para valorar del tamaño del CL, la concentración de  $P_4$ , el tiempo empleado en el paso del cérvix y el tiempo total empleado para realizar la transferencia en las receptoras diagnosticadas preñadas y vacías se utilizó la prueba de *t* de Student. El análisis del tiempo empleado en el paso del cérvix y el tiempo total empleado para realizar la transferencia al depositar el embrión en la parte craneal, medio o caudal del cuerno uterino se utilizó un ANOVA unidireccional y para comparar las medias la prueba de Tukey al 5 %. Para determinar la dependencia de la preñez con el tiempo empleado en el paso del cérvix, clasificado como fácil, moderado, difícil, el tiempo total empleado para realizar la transferencia (mínimo, moderado, largo) al depositar el embrión en la parte craneal, medio o caudal del cuerno uterino se utilizó Ji cuadrado. Se determinó la correlación entre el tamaño del CL, la concentración de  $P_4$  con la preñez mediante la correlación de Pearson.

### Protocolo de la sincronización del estro y de la transferencia embrionaria

En el día 0, se colocó un dispositivo intravaginal (DIV) de liberación de  $P_4$  (CIDR<sup>®</sup> 1,3 g; Zoetis, Perú) + 2 mg de Benzoato de estradiol (Gonadiol<sup>®</sup> 1 mg·mL<sup>-1</sup>; Zoetis, Perú), vía intramuscular (IM). En el día 7, por la mañana se aplicó 500 µg de prostaglandina IM (Ciclaste DL<sup>®</sup> 250 µg·mL<sup>-1</sup>; Zoetis, Perú) y se retiró el DIV; además, se aplicó un parche colorimétrico (A.I. Tags<sup>™</sup> C35069, EUA) para detectar la presentación del estro. Al día 8, las vaquillas recibieron 1 mg Benzoato de estradiol (IM), y 54 h posteriores al retiro del DIV (día 9) se observó la presencia

de celo y en el día 16 del protocolo se realizó la transferencia de embriones (FIG. 1).



**FIGURA 1. Protocolo de sincronización del celo y día de la transferencia de embriones en vaquillas Holstein mestizas**

### Valoración del tamaño del cuerpo lúteo de las receptoras

Previo a la TE a la receptora (día 16), se realizó una ecografía transrectal mediante un equipo portátil (Aloka ProSound 2<sup>o</sup>, Tokyo-Japón) con una sonda lineal de 7,5 MHz; con la finalidad de determinar la presencia y tamaño del CL, mediante la técnica descrita por Ayala y col. [23], que brevemente consistió en ubicar el CL y determinar el tamaño del mismo mediante la fórmula  $([\text{ancho} + \text{largo}]/2)$ . Las receptoras que presentaron CL compacto  $>15$  mm fueron ingresadas al experimento.

### Proceso de transferencia embrionaria

Los animales fueron colocados en la manga de manejo (Brete PLUS, Ecuador), cuidando la biosurididad de la receptora y del técnico. Luego se procedió a insensibilizar mediante la administración vía epidural de 4 mL de clorhidrato de lidocaína al 2 %, (Lidocaine<sup>TM</sup>, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina).

La técnica de descongelado y preparado de la pajilla que contenía el embrión fue realizada de forma similar en todas las transferencias. La pajilla fue extraída del tanque de nitrógeno con una pinza y se mantuvo por 5 s, a temperatura ambiental, luego fue sumergida en un termo de descongelación a 35°C por un lapso de 30 s, posterior a este tiempo se extrajo, se secó y colocó en la cánula de transferencia (Cánula MT 0,25, Minitube<sup>o</sup>, EUA) junto con un catéter de transferencia y una camisa sanitaria (Minitube<sup>o</sup>, EUA).

### Determinación del tiempo utilizado para atravesar el cérvix

El tiempo necesario para atravesar el cérvix fue considerado desde que el técnico ubicó la pistola de transferencia en la entrada de esta estructura hasta que pasó por completo el mismo (tiempo valorado en segundos). Este tiempo fue categorizado de acuerdo a la metodología descrita por Alkan y col. [7], con ciertas modificaciones: Grupo 1 (Fácil;  $<30$  s); Grupo 2 (Moderado; entre 30 y 60 s); Grupo 3 (Difícil;  $>60$  s).

### Ubicación del lugar de depósito del embrión

Se registró el lugar en el cual fue depositado el embrión: tercio craneal (Grupo 1), medio (Grupo 2) o caudal (Grupo 3) del cuerno uterino ipsilateral al CL. Esta información la proporcionó el técnico transferidor del embrión, que siempre fue el mismo en todas las transferencias realizadas.

### Medición del tiempo total utilizado para la transferencia

Para realizar la medición de esta variable se adaptó la metodología utilizada por Roper y col. [17]. Brevemente, se procedió a tomar el tiempo desde que la receptora ingresó a la manga de sujeción por primera vez, y terminó cuando el técnico retiró la pistola de transferencia de la receptora (tiempo en segundos). Estos resultados

fueron agrupados en: Grupo 1 (mínimo;  $<600$  s); Grupo 2 (moderado; 600 y 800 s); Grupo 3 (largo;  $>800$  s).

### Toma de muestras de sangre para valorar los niveles de progesterona

Luego de realizar la transferencia del embrión, se tomó 5 mL de sangre mediante punción en la vena coccígea, en tubos sin anticoagulante con sistema Vacutainer (Vacutainer<sup>o</sup>). Las muestras fueron colocadas en un termo (Chiller, 16 QT, Coleman<sup>o</sup>, EUA) con hielo (5°C) y se transportaron al laboratorio para ser centrifugadas (Hettich, Micro 200, Alemania) a 3.000 G  $\times$  10 min. El suero fue colectado y congelado a -20°C hasta su análisis (Congelador SMC, CG11HB, China).

La determinación de la concentración de  $P_4$  se realizó mediante ELISA kit (Bovine Progesterone, Fine Biotech, China). La dosis mínima detectable de  $P_4$  según el fabricante fue inferior a 0,31 ng·mL<sup>-1</sup> y el valor máximo de 20 ng·mL<sup>-1</sup>. Precisión intra-ensayo: CV% $<8$  %, precisión entre ensayos: CV% $<10$  %.

### Valoración de la gestación de las receptoras

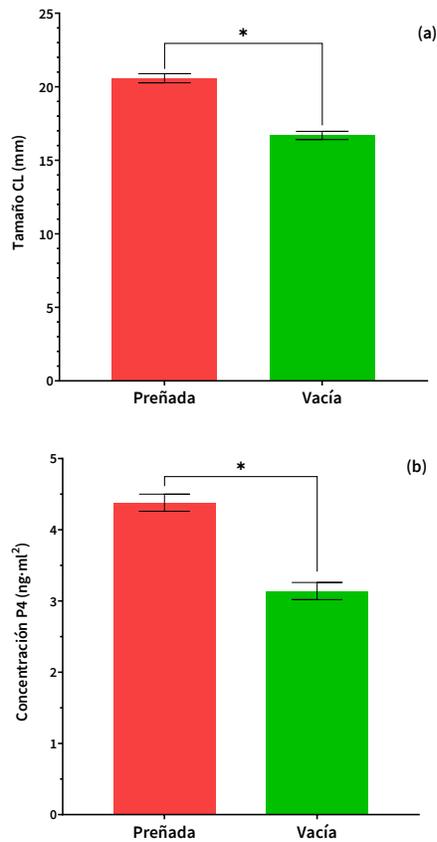
La determinación de la gestación en las receptoras se realizó 35 días post transferencia del embrión, mediante un ecógrafo (Aloka ProSound 2<sup>o</sup>, Tokyo-Japón) con una sonda lineal de 7,5 MHz, el diagnóstico fue realizado siempre por el mismo técnico. Los resultados obtenidos fueron organizados en grupo de receptoras preñadas (G1) y vacías (G2).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se transfirió un total de 40 embriones congelados-descongelados de calidad 1 (excelentes), obteniendo una tasa de gestación del 45 %. Estos resultados fueron concordantes (41,7 %) al transferir embriones congelados con Etilenglicol como crioprotector en ganado Holstein [24] o los determinados (45,4 %) para receptoras Hereford [25]. Así mismo Bényei y col. [26] en su estudio llevado a cabo en Brasil, utilizando embriones Holstein congelados por curva lenta y transferidos a receptoras *Bos indicus*  $\times$  *Bos taurus* obtuvieron un 41 % de gestación.

Al relacionar el tamaño del CL de las receptoras el día de la transferencia del embrión (día 16) con el diagnóstico de gestación realizado 35 días post transferencia, se determinó un valor medio de 20,6  $\pm$  0,31 mm para las donadoras diagnosticadas preñadas (G1) y 16,7  $\pm$  0,28 mm (G2) en las vacías (FIG. 2a), con diferencia estadística entre grupos ( $P<0,05$ ). Estos resultados demostraron que el tamaño del CL tiene un efecto positivo sobre la tasa de preñez, datos similares a los reportados por Alkan y col. [7], quienes observaron que las receptoras preñadas presentaron un CL de 21,1  $\pm$  0,04 mm y las diagnosticadas vacías (19,6  $\pm$  0,03 mm). Además, se determinó una correlación alta y positiva entre el tamaño del CL y la preñez ( $r=0,84$ ). Sin embargo, existen trabajos que describen que el diámetro del CL no influye sobre el porcentaje de preñez, pero la calidad del embrión sí afecta el porcentaje de preñez [27]. Para evitar esta interferencia en los resultados en el presente estudio se transfirieron únicamente embriones de calidad 1 (excelentes).

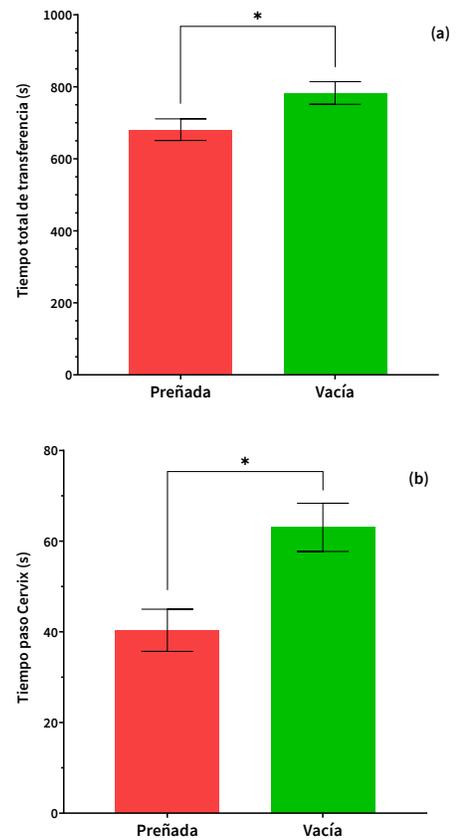
La concentración de  $P_4$  presente en el día 16 del protocolo fue mayor en animales gestantes (4,4  $\pm$  0,12 ng·mL<sup>-1</sup>) frente a 3,1  $\pm$  0,11 ng·mL<sup>-1</sup> de las receptoras diagnosticadas vacías (FIG. 2b;  $P<0,05$ ), con una correlación alta y positiva ( $r=0,77$ ). Por lo tanto, receptoras con CL más grandes mantienen niveles mayores de  $P_4$ , factor esencial para mantener la gestación; además, la  $P_4$  coadyuva en la producción de interferón tau por parte del trofoblasto el cual permite el reconocimiento materno fetal y evita la producción de



**FIGURA 2. (a):** Promedio del tamaño del cuerpo lúteo (CL) expresado en (mm) de las receptoras preñadas y vacías. **(b):** Promedio de la concentración de progesterona (P<sub>4</sub>) de las receptoras preñadas y vacías. Prueba de *t* de Student. \*:diferencia estadística entre grupos. Correlación de Pearson entre el tamaño del CL y la preñez ( $r=0,84$ ). Correlación entre la concentración de P<sub>4</sub> y preñez ( $r=0,77$ ), con valor de  $P<0,001$

prostaglandina [28]. Es importante resaltar que en los últimos años existen estudios con resultados contradictorios sobre la morfología del CL y la producción de P<sub>4</sub>; por ejemplo, en un trabajo realizado en vaquillas Holstein se determinó que el CL cavitario producía mayor cantidad de P<sub>4</sub> (11,31 ng·mL<sup>-1</sup>) en comparación con las receptoras que presentaron CL compacto (7,15 ng·mL<sup>-1</sup>) y que el porcentaje de preñez fue mayor en los animales con CL cavitario (47,7%). Esto demostró que el CL cavitario proporciona al embrión mejores posibilidades de sobrevivir al momento del reconocimiento de la preñez y, en consecuencia, puede tener un efecto positivo en el porcentaje de preñez en las receptoras [29]; sin embargo, autores como Gomes y col. [30], en su estudio realizado en ganado de carne en el trópico bajo llegaron a determinar que la tasa de concepción y la ocurrencia de pérdida de preñez en el programa TE en ganado vacuno están relacionadas con la irrigación sanguínea del CL pero no con el tamaño del mismo. Nuestros resultados no permiten descartar esta posibilidad, por lo que debería ser estudiada en trabajos futuros.

Al analizar el tiempo que el técnico requirió para pasar el cervix durante la TE, se determinó que en receptoras gestantes (G1) el tiempo empleado fue de  $40,3 \pm 4,65$  s, valor menor al utilizado en los animales ( $63,0 \pm 5,32$  s) vacíos (G2; FIG. 3b). Con una correlación media y positiva entre estas dos variables  $r=0,45$ .

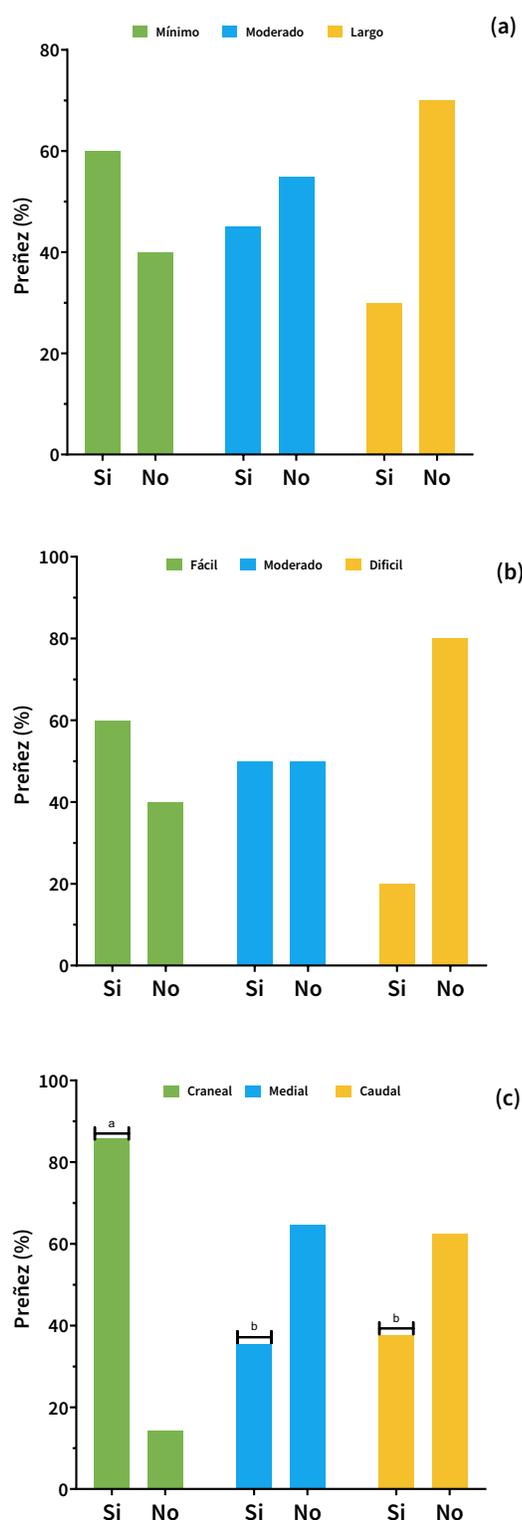


**FIGURA 3. (a):** Promedio del tiempo total empleado en el proceso de la transferencia del embrión en receptoras diagnosticadas preñadas, vacías. **(b):** Tiempo promedio necesario para pasar el cervix en receptoras diagnosticadas preñadas y vacías. Valor de correlación de Pearson entre el tiempo total empleado para realizar la transferencia y la preñez ( $r=0,35$ ). Correlación entre el tiempo utilizado en pasar el cervix y la Preñez ( $r=0,45$ ),  $P<0,05$

Cuando los resultados del tiempo utilizado para pasar el cervix de las receptoras fueron organizados en grupos: G1 (Fácil), G2 (Moderado) y G3 (Difícil) y en cada grupo se analizó la tasa preñez, se observó que las receptoras clasificadas como de paso fácil (G1; 60 %) presentaron 10 puntos porcentuales más preñeces que las de G2 (50 %) y 40 puntos porcentuales más que G3 (20 %; FIG. 3b), a pesar de los valores registrados no existió diferencia estadística entre grupos ( $P>0,05$ ).

Los resultados obtenidos en el presente estudio son concordantes con los obtenidos en vaquillas Simmental, donde se observó mayor porcentaje de preñez en receptoras con fácil paso del cervix (43,5 %) frente a las clasificadas como de moderado (36,2 %) y difícil (26,1 %) paso [7]. Además, existen trabajos en los que se determinó que demorarse  $>80$  s en pasar el cervix disminuye drásticamente la preñez de la receptora [16].

El tiempo total utilizado para realizar la TE fue 103 s, más alto en receptoras vacías ( $783,0 \pm 31,43$  s) comparado con las gestantes ( $680,9 \pm 29,93$  s; FIG. 2a). Cuando los resultados del tiempo total empleado para la TE fueron organizados en grupos: G1 (Mínimo; 60 %), G2 (Moderado; 45 %) y G3 (Largo; 30 %) y se relacionó con la preñez, se observó una diferencia porcentual importante pero no estadística ( $P>0,05$ ; FIG. 4a) entre grupos.



**FIGURA 4. (a):** Porcentaje de receptoras preñadas en el grupo que necesitó un tiempo total mínimo (G1), moderado (G2), largo (G3) para cumplir con el proceso de transferencia del embrión. **(b):** Porcentaje de receptoras preñadas en el grupo clasificado como de fácil (G1), moderado (G2) o difícil (G3) paso por el cérvix. **(c):** Porcentaje de receptoras preñadas en el grupo que se depositó el embrión en el tercio craneal (G1), medio (G2) o caudal (G3) del cuerno uterino. Prueba de ji cuadrado al 5%. ab=diferencia estadística entre grupos

Se ha descrito que los animales que requieren entre 6 a 9 min (tiempo mínimo) presentaron mayor porcentaje de preñez (60 %) en comparación con las receptoras en las cuales se demoró el doble de tiempo (10 a 13 min; 37 % de preñez) o el triple (14 a 25 min; 25 % de preñez) [17]. Este factor está relacionado con la facilidad del paso del cérvix, ya que cuanto más se demore en transferir el embrión aumenta la manipulación del tracto reproductivo, acción que puede desencadenar la liberación de PGF2 $\alpha$  y como es conocido las células de un embrión en esta etapa (mórula o blastocisto) poseen receptores para PGF2 $\alpha$ , de allí que podría producirse la lisis del CL y una mortalidad embrionaria temprana [31, 32]. Por lo tanto, cuanto más se demore el técnico en completar la TE disminuye la probabilidad de gestación de la receptora [17].

Los resultados de las investigaciones descritas y lo encontrado en el presente trabajo permiten señalar que el tiempo total empleado para realizar la TE, que incluyen las evaluaciones iniciales de las estructuras ováricas, el tiempo necesario para preparar el embrión y la cantidad de tiempo para completar la transferencia; es un factor influyente en las tasas de gestación dentro de los programas de TE.

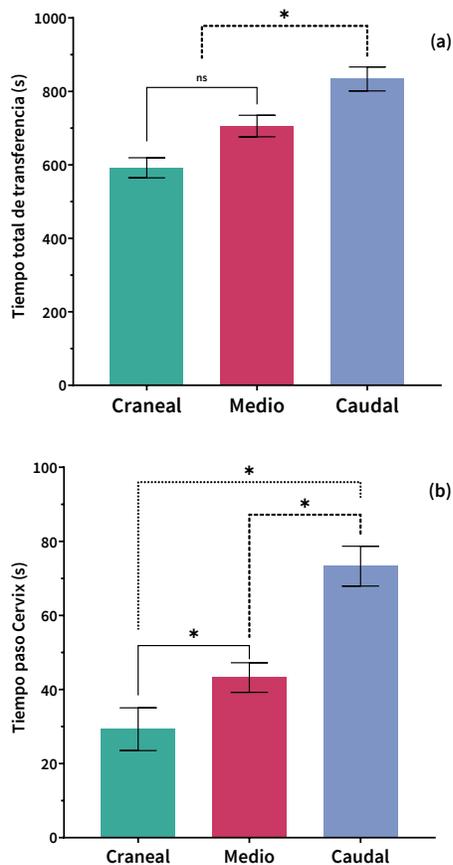
Al analizar si la preñez de la receptora (18/40) tenía dependencia del lugar donde fue depositado el embrión, se estableció que al depositar el concepto en el tercio craneal los animales presentaron mayor porcentaje de preñez (86 %), que al colocar el embrión en el tercio medio (35 %) o tercio caudal (38 %) del cuerno uterino ( $P < 0,05$ ); por lo tanto, colocar el embrión en el tercio craneal del cuerno uterino permite elevar 51 puntos porcentuales la posibilidad de una gestación (FIG. 4c).

Cuando se determinó el tiempo promedio requerido para depositar el embrión en la porción craneal (G1;  $592,0 \pm 27,28$  s), media (G2;  $705,7 \pm 29,38$  s) o caudal (G3;  $833,8 \pm 32,52$  s) del cuerno uterino, se observó que el tiempo requerido para los grupos 1 y 2 fue similar ( $P > 0,05$ ), sin embargo, fue menor al requerido para depositar en el embrión en el tercio caudal del cuerno uterino, con diferencia estadística entre estos grupos ( $P < 0,05$ ; FIG. 5a).

El tiempo promedio utilizado para pasar el cérvix en las donadoras en las cuales el embrión fue depositado en el tercio craneal del útero (G1;  $29,2 \pm 5,76$  s), medio (G2;  $43,2 \pm 3,98$  s), caudal (G3;  $73,1 \pm 5,38$  s), mostraron diferencia estadística entre estos tres grupos (FIG. 5b).

Alkan y col. [7], en su estudio obtuvieron mayor tasa de preñez cuando los embriones se colocaron en el tercio craneal del cuerno uterino con un 41,06 %, mientras que al depositar los embriones en el tercio medio la tasa de preñez fue de 29,67 % ( $P < 0,05$ ), existiendo por tanto una diferencia significativa. Los resultados obtenidos en el presente estudio guardan concordancia con el tiempo requerido en forma fisiológica por el embrión para trasladarse desde el lugar de la fecundación (ámpula) hasta la parte craneal del cuerno uterino (7 días) [27]. Además, se ha determinado que el embrión de siete días generalmente se encuentra ubicado en la parte craneal del cuerno uterino [33], por lo que al depositar en este lugar se asura mayor posibilidad de preñez [18].

Roper y col. [17], también determinaron que la tasa de gestación varía en base a la ubicación de la transferencia del embrión ( $P = 0,08$ ), pero sin diferencia estadística; así cuando el embrión se depositó en el tercio craneal se obtiene un 43 %, en el tercio medio un 31 % o tercio caudal un 24 %. A decir de los autores, estos resultados indican que es más probable que los embriones depositados en el tercio craneal del cuerno ipsilateral al CL resulten en una gestación después de la



**FIGURA 5. (a): Tiempo total empleado en realizar todo el proceso de transferencia del embrión en el tercio craneal, medio o caudal del cuerno uterino. (b): Tiempo necesario para pasar el cérvix y depositar el embrión en el tercio craneal, medio o caudal del cuerno uterino. \*: diferencia estadística, prueba de Tukey al 5%**

TE, pero es importante considerar el nivel de dificultad para colocar el embrión en el tercio craneal del cuerno uterino cada vez que se transfiere un embrión.

Por su parte Ongubo y col. [19], lograron una mayor tasa de concepción cuando los embriones se depositaron en el tercio medio del cuerno uterino (48,84%), en comparación con el tercio inferior (26,9%) y el tercio superior (20,9%;  $P < 0,05$ ). Esto estaría relacionado al hecho de que, al depositar el embrión en la parte superior del cuerno, se requiere una manipulación más intensa del útero, lo cual podría provocar lesiones o estrés en la receptora. Este factor desencadena un proceso inflamatorio que, a su vez, libera prostaglandinas, resultando en la lisis del CL y reduciendo la tasa de concepción.

Los resultados de investigaciones recientes, y los obtenidos en el presente trabajo sugieren que la tasa de gestación en las receptoras es mayor cuando los embriones son depositados en el tercio craneal del cuerno uterino ipsilateral al CL, pero se debe considerar el nivel de dificultad que conlleva aquello, tomando en cuenta aspectos como obstrucciones en el tracto uterino, comportamiento de la receptora y experiencia del técnico.

## CONCLUSIONES

Las receptoras que poseen un CL  $> 20$  mm en el momento de la transferencia del embrión proporcionan mayor concentración de Progesterona, factor que incrementa la probabilidad de establecer una gestación. Además, cuanto menos tiempo se requiera para pasar el cérvix, el embrión podrá ser depositado con menor manipulación en el tercio craneal del cuerno uterino, disminuyendo el tiempo total empleado en la transferencia del embrión, lo cual incrementa la tasa de concepción.

## RECOMENDACIONES

Continuar estudiando los diferentes factores que pueden afectar la tasa de preñez de las receptoras.

## Conflicto de interés

Los autores confirman que no existen conflictos en el presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenol.* [Internet]. 2014; 81(1):152–169. doi: <https://doi.org/mfqs>
- [2] Viana JHM, Siqueira LGB, Palhão MP, Camargo LS de A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Sci.Vet.* [Internet]. 2010 [consultado 27 Jul. 2023]; 38(Suppl.2):661–674. Disponible en: <https://goo.su/OCWgo>.
- [3] Dochi O. Direct transfer of frozen–thawed bovine embryos and its application in cattle reproduction management. *J. Reprod. Dev.* [Internet]. 2019; 65(5):389–396. doi: <https://doi.org/mfqt>
- [4] Hansen PJ. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *J. Anim. Sci.* [Internet]. 2020; 98(11):skaa288. doi: <https://doi.org/grprnn>
- [5] Ferraz PA, Burnley C, Karanja J, Viera–Neto A, Santos JEP, Chebel RC, Galvao KN. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenol.* [Internet]. 2016; 86(7):1834–1841. doi: <https://doi.org/f849gt>
- [6] Hasler JF. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenol.* [Internet]. 2006; 65(1):4–16. doi: <https://doi.org/c72hkj>
- [7] Alkan H, Karaşahin T, Dursun Ş, Satılmış F, Erdem H, Güler M. Evaluation of the factors that affect the pregnancy rates during embryo transfer in beef heifers. *Reprod. Domest. Anim.* [Internet]. 2020; 55(4):421–428. doi: <https://doi.org/mfqv>
- [8] Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenol.* [Internet]. 2001; 56(9):1401–1415. doi: <https://doi.org/dc592z>
- [9] Córdova A, Guerra J, Villa A, Olivares J, Cansino G, Juárez M, Pérez JF. Congelación de embriones bovinos. *Rev. Complut. Cien. Vet.* [Internet]. 2015; 9(2):22–40. doi: <https://doi.org/mfqx>

- [10] Oyuela LA, Jiménez C. Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Rev. Med. Vet. Zoot.* [Internet]. 2010 [consultado 27 Ago. 2023]; 57(3):191-200. Disponible en: <https://goo.su/AUWTU>.
- [11] Tovío-Luna N, Duica-Amaya A. Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. *Spei Domus* [Internet]. 2012 [consultado 27 Ago. 2023]; 8(17):38-47. Disponible en: <https://goo.su/YRoCz1>
- [12] Morotti F, Moretti R, dos Santos GMG, Silva-Santos KC, Ramos-Cerqueira PH, Seneda MM. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* [Internet]. 2018; 188:170-177. doi: <https://doi.org/jrfm>
- [13] Oshba M, Sosa G, Nossier M, Fadel M, El-Raey M. The Effect of Recipient Holstein heifers' *Corpus Luteum* Type, Diameter and Secretory Potential on their Pregnancy Rate during Routine ET program in Egypt. *Benha Vet. Med. J.* [Internet]. 2019; 36(1):77-87. doi: <https://doi.org/mfqz>
- [14] Pérez-Mora A, Sura-Correa JC, Peralta-Torres JA. Factors associated with pregnancy rate in fixed-time embryo transfer in cattle under humid-tropical conditions of Mexico. *Anim. Reprod.* [Internet]. 2020; 17(2):e20200007. doi: <https://doi.org/d25q>
- [15] Aguiar TS, Araújo C V., Tirloni RR, Martins LR. Effect of meloxicam on pregnancy rate of recipient heifers following transfer of *in vitro* produced embryos. *Reprod. Domest. Anim.* [Internet]. 2013; 48(6):984-988. doi: <https://doi.org/mfq2>
- [16] Lopes LMJ, Balbinot M, Fonseca BA, de Araújo CV, Martins LR. Pregnancy rates and serum 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  concentrations in recipient Nelore heifers treated with meloxicam after the transfer of *in vitro*-produced embryos. *Theriogenol.* [Internet]. 2015; 84(4):553-558. doi: <https://doi.org/mfq3>
- [17] Roper DA, Schrick FN, Edwards JL, Hopkins FM, Prado TM, Wilkerson JB, Saxton AM, Young CD, Smith WB. Factors in cattle affecting embryo transfer pregnancies in recipient animals. *Anim. Reprod. Sci.* [Internet]. 2018; 199:79-83. doi: <https://doi.org/mfq4>
- [18] Hasler JF. Bovine Embryo Transfer: ¿Are Efficiencies Improving? En: Conference Proceedings Applied Reproduction Strategies [Internet]. 5-6 Jun 2010 Nashville, TN, USA; [consultado 22 Jul. 2023]. p. 265-282. Disponible en: <https://goo.su/o090>.
- [19] Ongubo MN, Rachuonyo HA, Lusweti FN, Kios DK, Kitilit JK, Musee K, Tonui WK, Lokwaleput IK, Oliech GO. Factors affecting conception rates in cattle following embryo transfer. *Uganda J. Agric Sci.* [Internet]. 2015; 16(1):19-27. doi: <https://doi.org/mfq9>
- [20] Hoedemaker M, Prange D, Gundelach Y. Body Condition Change Ante- and Postpartum, Health and Reproductive Performance in German Holstein Cows. *Reprod. Domest. Anim.* [Internet]. 2009; 44(2):167-173. doi: <https://doi.org/fht8nq>
- [21] Naranjo-Chacón F, Montiel-Palacios F, Canseco-Sedano R, Ahuja-Aguirre C. Embryo production in middle-aged and mature *Bos taurus*  $\times$  *Bos indicus* cows induced to multiple ovulation in a tropical environment. *Trop. Anim. Health Prod.* [Internet]. 2019; 51(8):2641-2644. doi: <https://doi.org/mbdh>
- [22] Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health [Internet]. Organización Mundial Sanidad Animal. 2015 [consultado 22 Jul. 2023]; p. 1-3. Disponible en: <https://goo.su/5NfdSw>
- [23] Ayala LE, Pesantez JL, Rodas ER, Dután JB, Calle GR, Murillo YA, Vázquez JM, Nieto PE, Ortega VV, Samaniego JX. Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Arch. Zoot.* [Internet]. 2019; 68(262):186-192. doi: <https://doi.org/mfrb>
- [24] Bó GA, Moreno D, Cutaia LE, Caccia M, Tribulo RJ, Tribulo HE. Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus* [Internet]. 2004 [consultado 22 Jul. 2023]; 4(21):25-45. Disponible en: <https://goo.su/qKOS16c>.
- [25] Martínez AG, Brogliatti GM, Valcarcel A, de las Heras MA. Pregnancy Rates After Transfer of Frozen Bovine Embryos: A Field Trial. *Theriogenol.* [Internet]. 2002; 58(5):963-972. doi: <https://doi.org/cwkm6x>
- [26] Bényei B, Komlósi I, Pécsi A, Pollott G, Marcos C, de Oliveira-Campos A, Lemes MP. The Effect of Internal and External Factors on Bovine Embryo Transfer Results in a Tropical Environment. *Anim. Reprod. Sci.* [Internet]. 2006; 93(3-4):268-279. doi: <https://doi.org/cvp5jw>
- [27] Pérez-Mora A, Sura-Correa JC, Peralta-Torres JA. Factors associated with pregnancy rate in fixed-time embryo transfer in cattle under humid-tropical conditions of México. *Anim. Reprod.* [Internet]. 2020; 17(2):202-216. doi: <https://doi.org/d25q>
- [28] Bilodeau-Goeseels S, Kastelic JP. Factors affecting embryo survival and strategies to reduce embryonic mortality in cattle. *Can. J. Anim. Sci.* [Internet]. 2003; 83(4):659-671. doi: <https://doi.org/ffzkc6>
- [29] Jaśkowski BM, Herudzińska M, Gehrke M, Niżański W. The impact of the cavitary corpus luteum on the blood progesterone concentration and pregnancy rate of embryo recipient heifers. *Theriogenol.* [Internet]. 2022 178:73-76. doi: <https://doi.org/mfrk>
- [30] Gomes dos Santos GM, Bortolassi L, Silva-Santos KC, Ayres Dias J, da Silva Dias I, Seneda M, Morotti F. Conception rate and pregnancy loss in fixed-time cattle embryo transfer programs are related to the luteal blood perfusion but not to the corpus luteum size. *Theriogenol.* [Internet]. 2023; 210:251-255. doi: <https://doi.org/mfrm>
- [31] Scenna FN, Edwards JL, Rohrbach NR, Hockett ME, Saxton AM, Schrick FN. Detrimental effects of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on preimplantation bovine embryos. prostaglandins other lipid. *Mediat* [Internet]. 2004; 73(3-4):215-26. <https://doi.org/cfv5n7>
- [32] Scenna FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Rohrbach NR, Wehrman ME, Schrick FN. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. prostaglandins other lipid *Mediat.* [Internet]. 2005; 78(1-4):38-45. doi: <https://doi.org/cbf6bg>
- [33] Sponchiado M, Gonella-Díaza AM, Rocha CC, Lo Turco EG, Pugliesi G, Leroy JLMR, Binelli M. The pre-hatching bovine embryo transforms the uterine luminal metabolite composition *in vivo*. *Sci. Rep.* [Internet]. 2019; 9(1):1-14. doi: <https://doi.org/gf8hcf>