

01621
8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA TRANSFERENCIA DE UN EMBRIÓN Y DE LA MEGLUMINA DE FLUNIXIN SOBRE EL ÍNDICE DE GESTACIÓN DE VACAS HOLSTEIN REPETIDORAS, POSTINSEMINADAS.

TESIS

Que para obtener el título de

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta:

María Arlette Barrera Gaona

Asesores:

**MVZ Jorge Ávila García
MVZ DMV Javier Valencia Mendéz
MVZ Msc PhD Pedro Ochoa Galván**

México, DF



2003

a



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A ti Flaquito por quien fui y soy ...

A mi padre Jorge Barrera Fernández por darme la vida, valores, amor y demostrarme que no hay nada en el mundo que pueda mas que la determinación de los ideales.

A mi madre Mary Gaona Tapia por dar parte de su vida, amor y ternura encada cosa que hace, por enseñarme que hay algo mas allá de lo que podamos creer.

A Jorge por insistir en la diferencia entre el bien y el mal y por cuidarme tanto.

A Miguel Ángel por ser cómplice en tantas aventuras y ser mi máximo ejemplo.

Gracias a todos ustedes por darme la oportunidad de ser tan feliz y de crecer en una

FAMILIA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e imp-
contenido de mi trabajo (educación)
NOMBRE: MARIA ARLETTE
BARRERA GAONA
FECHA: 27-JUNIO-03
FIRMA: [Firma]

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme la oportunidad de formar parte de ella y contribuir a mi formación profesional y personal.

Al MVZ. Jorge Ávila García por enseñarme lo que es un verdadero "médico veterinario", por permitirme trabajar a su lado, por la paciencia, apoyo y amistad a lo largo de este trabajo, y por la sencillez con que siempre ha compartido sus conocimientos.

Al Dr. Javier Valencia por su valiosa participación y disponibilidad en este trabajo y por ser siempre tan amable.

Al Dr. Pedro Ochoa Galván quien desinteresadamente formo parte clave del presente trabajo y por la calidad de su tiempo.

Al Departamento de Reproducción Animal de la FMVZ por la donación de los embriones.

A todos los miembros del H. Jurado por su tiempo y valiosas correcciones:

Dr. Posadas quien ha contagiado a lo largo de mi formación las ganas con que se debe trabajar y seguir estudiando.

Dr. Porras por sus consejos, amistad y permitir que formara parte de su equipo de trabajo por un tiempo.

Dr. Cano por permitir que formara parte de la familia de CEPIER por tanto tiempo.

Dr. Joel Hernández por su apoyo y consejos desde que lo conozco.

A Don Juan y su familia (Juan chico, Rosa, Don Raúl), al personal de Villa María ("El Mayor" Manuel, Nicolás, Sra. Margarita, Luisa Javier, Salvador, Lalo), por abrirme las puertas y permitir realizar este trabajo, siguiendo con mi crecimiento profesional. A Don Emilio dueño del Rancho El Olimpo por permitir la investigación en su hato; a su personal (Mario, Carlos, Gabino, Chon, Martín) por hacer el trabajo muy agradable. A los Dueños

C

de Santa Mónica, a Raúl por ser tan amable, a Tucá y el Caporal por cooperar en este trabajo.

A Polo quien sin vacilar cuidó de nuestro camino.

A la Familia Gaona Salado por abrir las puertas de su casa y corazón, por ser mi segunda familia y por hacer tan divertidos los días desde que inicie mi carrera hasta ahora. Tía Pera por todo tu cariño, amor, desmañanadas y preocupación, Tío Adrián por todo tu cariño, sencillez y amor con que tratas a tu familia; Ivette por ser mi confidente, amiga y compañera de diversión, estudio y deporte, por todos esos años maravillosos; Mayis por ser cómplice de las movidas, tu confianza y compartir la jornada, Eli por tu espontaneidad, Spike por siempre estar ahí.

A mi Familia, Abue Caro por quererme tanto. Familias Barrera Fernández y Gaona Tapia por estar siempre unidos. Mary, Chelo y Edith por ser las hermanas que no tuve.

A todos los maestros quienes contribuyeron en mi formación, los recuerdo con cariño (Dr. Pablo, Dr. F. Basurto)

A quienes indudablemente forman parte de mi corazón y estarán ahí siempre: Jorge GM, Glory VF, Leonardo AS, Faby S, Raquel, Karliux, Carlos C, Joe, Morax, Santurtun, Ponchito, Daniel VI, Oliver, Juan Manuel, Mario, Ivan, Veyan, Daniel Lezama, por hacer esos primeros semestres inolvidables.

A Fabiola, Alejandra, Miguel MA, Alex, Sergio Lucio, Tere por todos esos ratos.

Un poco después, pero también en mi corazón Nadia, Max, Puga (la pareja oficial de baile), Homero, Gris, David, Lucky, Oscar, Nico, Edgar, por inducirme a las fiestas, y brindarme su amistad siempre.

A los chavos de CEPIER: Julio (por ser mi "jefe" y hermano mayor), Sergio (por permitir que te conociera un poco más y tu cariño) Richard, Marco, Federico, Alex, Juan, Angel, Claudia, por permitirme formar parte de la familia y por su gran ayuda en la superovulación, guardias de calores y cuidarme tanto. A todos los voluntarios.

A los que hicieron posibles esos inolvidables días en el Clarín Adriana (Boo), Jaime (Novato), Ari, Vanne, Eli, Adriana, Lalo, Tito, Iker, Gaston, Carlitos, Gabo, Vic, Oscar, Bam Bam (por tu apoyo y comprensión incondicional), Cesar, Jael, Cipatli, Mariano, JuanJo, Soldadito, Espiri, Berna, Sabino, Mafer, Chava, Chucho, Yako, Chano, Colombianos, los del Inter. (Araceli, Héctor), Pepe Oropeza y académicos del Rancho los doctores: Basurto, Livas, Rebeca, Lety, Migue, Manuel, Ivette, Bernardo, Hugo, Jorge Armando, Cristino, los ingenieros Epi, Jarillo, Eleazar, Aluja y por supuesto German, por brindarme su amistad.

A Ricardo Gómez Reynoso por ser tan positivo, apasionado en el trabajo y darme la oportunidad de ver la vida desde otro ángulo, por estar cuando más lo necesitaba.

A todos los chavos de Maestría de Repro (miembros del DASA) Soledad, Paulo, Martín, Iván, Paula, Paulina, Simone, Agustín e Isabel por brindarme su amistad.

A Fer C. por esos ratos.

CONTENIDO

<u>CAPÍTULO</u>	<u>PÁGINA</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	10
DISCUSIÓN	12
LITERATURA CITADA	18

RESUMEN

María Arlette Barrera Gaona. EFECTO DE LA TRANSFERENCIA DE UN EMBRIÓN Y DE LA MEGLUMINA DE FLUNIXIN SOBRE EL ÍNDICE DE GESTACIÓN DE VACAS HOLSTEIN REPETIDORAS, POSTINSEMINADAS. (Bajo la asesoría de: MVZ Jorge Ávila García, de: MVZ DMV Javier Valencia Méndez y de: MVZ MSc PhD Pedro Ochoa Galván).

Se evaluó el efecto de la transferencia de un embrión a vacas Holstein con el síndrome de repetición de servicios previamente inseminadas, así como el uso de un antiinflamatorio no esterooidal (me glumina de flunixin) 2 a 5 minutos antes de realizar la transferencia embrionaria con el fin de incrementar el índice de gestación en este tipo de vacas.

Se utilizaron vacas de 3 establos, de la raza Holstein Friesian clínicamente sanas, con un mínimo de un parto y más de 3 servicios infértiles, sin anomalías en el aparato reproductor y con ciclos estrales de duración normal. Las hembras tenían una condición corporal entre 3 y 3.5 puntos (Escala 1 – 5 donde: 1 = caquética, 5 = obesa) mismas que se encontraban lactando, bajo un sistema de producción intensivo, con dos ordeños al día. Se formaron 3 grupos al azar de 15 animales cada uno (Grupo A o testigo, B y C) , de los cuales había 5 animales representativos de cada grupo en cada uno de los establos. En los tres grupos las vacas fueron inseminadas 12 a 16 horas después de observar el celo natural; en el grupo B, 7 u 8 días después se les transfirió un embrión F1 (Bos taurus x Bos indicus) y en el grupo C se administraron 500 mg de me glumina de flunixin 2 a 5 minutos antes de realizar la transferencia embrionaria. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación vía rectal 45 a 50 días después de la inseminación artificial.

El índice de gestación fue de 46.6, 33.3 y 46.6 % para los grupos A, B y C, respectivamente ($P > 0.05$). Solamente en el grupo C ocurrió un parto gemelar. Todas las crías nacidas fueron de la raza Holstein, excepto en el grupo C, en el que 2 crías nacidas fueron Holstein y 5 F1. Se concluye que la transferencia de un embrión, previa aplicación de me glumina de flunixin, no aumentó los índices de concepción en vacas repetidoras inseminadas.

INTRODUCCIÓN

El acelerado avance genético, aunado a mejoras en la nutrición y al manejo ha aumentado significativamente la producción láctea del ganado lechero, en especial en la raza Holstein. El aumento en la producción ha tenido algunas consecuencias indeseables, por ejemplo existe una relación negativa entre la producción láctea y el comportamiento reproductivo^{1,2}, de tal manera que en la actualidad es difícil obtener tasas de gestación del 40%³.

La disminución en la eficiencia reproductiva provoca una gran pérdida económica que se refleja en la rentabilidad de la empresa,⁴ al tener un menor número de becerros, un aumento en la tasa de desecho involuntario así como un incremento en los costos de mantenimiento y un progreso genético poco acelerado del hato⁵.

Dado que la baja tasa de concepción es una de las principales causas de desecho en los bovinos productores de leche⁶ numerosos investigadores⁷⁻¹¹ se han centrado en el estudio de el "síndrome de repetición de servicios o vacas repetidoras de estros". Bajo esta denominación se clasifican aquellas vacas clínicamente sanas que han sido inseminadas tres o más veces sin quedar gestantes, con ciclos estrales de duración normal, ausencia de anomalías en el aparato reproductor, -detectadas mediante la técnica de palpación vía rectal- y que hayan parido anteriormente por lo menos una vez⁴.

Normalmente, la incidencia de fallas en la fertilización en vacas ocurre sólo en un 5 a 10 %¹² siendo este porcentaje igual en "vacas normales" que en vacas que presentan el síndrome de repetición de servicios, sin embargo los índices de fertilidad de estas últimas son relativamente bajos¹³.

Linares *et al.*⁹ al comparar el desarrollo embrionario entre vaquillas de primer servicio clasificadas como fértiles y vaquillas con tres o más servicios clasificadas como repetidoras o subfértiles, observaron que los embriones provenientes de vaquillas

repetidoras presentaron con frecuencia retraso en su desarrollo y deficiente diferenciación celular, lo que impide la síntesis de las señales embrionarias que contribuyen al reconocimiento materno de la gestación. La falla en el reconocimiento materno de la gestación da lugar a la regresión del cuerpo lúteo, presentándose un nuevo ciclo estral de duración normal¹⁴. Esto sugiere que la mayor causa de servicios infructuosos se debe a una mortalidad embrionaria temprana¹⁵.

Con base en lo anterior se han puesto en práctica diversos métodos que conducen a mejorar la función del cuerpo lúteo y obtener una mayor fertilidad o porcentaje de concepción en este tipo de vacas.

La aplicación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en diferentes fases del ciclo estral, ya sea al momento de la inseminación artificial o durante el diestro mantienen las concentraciones de progesterona elevadas¹⁶, sin embargo al administrar GnRH no se evita la secreción de prostaglandinas que causan la regresión del cuerpo lúteo¹⁷. Debido a que los resultados obtenidos son tan variables no se sustenta la aplicación práctica de estas terapias^{16,18,19}.

Otra alternativa ha sido la administración de progesterona, sin embargo, esta estrategia tampoco se ha validado satisfactoriamente y se conocen algunas desventajas, como es la supresión en la frecuencia de los pulsos de la hormona luteinizante por la hipófisis²⁰. Así al restringir la principal hormona luteinizante, mediante la suplementación exógena de progesterona se provoca una reducción en la producción endógena de la misma²¹. Debido a estos efectos adversos se dificulta su uso como herramienta para mejorar la fertilidad.

Recientemente se ha implementado la transferencia de embriones a vacas repetidoras, 7 días después de presentar estro²² o 7 días después de haber sido inseminadas^{3,23}, al transferirse un embrión a este tipo de vacas se ha conseguido que mantengan y lleven a

término la gestación, ya que el embrión transferido tiene la capacidad de evitar la luteolisis^{3,22,23} al llevar a cabo el reconocimiento materno de la gestación²⁴, de tal forma que el embrión nativo tiene mayor probabilidad de implantarse. Estas técnicas han dejado ver una alternativa en este tipo de vacas, puesto que se han obtenido resultados favorables^{3,22,23}.

El mecanismo utilizado por el embrión para evitar la cascada de eventos que conducen a la liberación pulsátil de prostaglandina F2 α (PGF2 α), que causa la luteolisis, consiste en la secreción de la proteína trofoblástica bovina, también conocida como interferón Tau (INF τ)^{24,25,26}. El INF τ inhibe a los receptores de estrógenos y permite reducir la secreción de PGF2 α ; puesto que la secreción uterina de PGF2 α es estimulada por oxitocina circulante y la expresión uterina de receptores para oxitocina es inducida por estrógenos²⁷. Al mismo tiempo se estimula la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) en las células epiteliales del endometrio, la cual favorece la implantación y permite reducir la respuesta inmune hacia el embrión²⁸. Actuando el INF τ como un agente antiluteolítico e inmunosupresor²⁹.

Por otra parte Schallenberg *et al.* (1989) han observado que al manipular el aparato reproductivo durante la inseminación artificial o la transferencia de embriones, se induce la liberación de prostaglandinas³⁰. También, algunos investigadores han demostrado que las prostaglandinas ejercen un efecto degenerativo en el desarrollo del embrión, siendo más susceptibles en la fase transición de mórula a blastocisto^{31,32}, de tal manera que si se disminuye la síntesis de prostaglandinas en la transferencia el embrión se vería menos afectado.

Con el objetivo de probar esta hipótesis *in vivo*, Schrick *et al.* administraron un antiinflamatorio no esterooidal (meclumina de flunixin* 1.1 mg / kg) 2 a 5 minutos antes de

* Banamine. Schering Corp., Kenilworth, NJ

realizar una transferencia embrionaria por el método no quirúrgico en vacas productoras de carne. Los resultados demostraron que el grupo al que fue administrado el antiinflamatorio tuvo un mayor índice de fertilidad (70.4 %), comparado con el grupo testigo (54 %)³³; estos resultados se obtuvieron con embriones de excelente calidad y congelados en etilenglicol, por el contrario no encontraron efectos benéficos de la meglumina de flunixin en la transferencia de embriones congelados con glicerol. Las evidencias anteriores permiten sugerir que la transferencia de un embrión en vacas con el síndrome de repetición de servicios, aunado a la administración de un antiinflamatorio no esterooidal pueden incrementar el índice gestación de vacas Holstein en sistemas de producción intensivos.

HIPÓTESIS

En vacas con síndrome de repetición de servicios inseminadas, el índice de gestación se incrementará al transferir un embrión viable fertilizado in vivo y criopreservado, en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo.

La aplicación de una dosis de meglumina de flunixin en vacas con el síndrome de repetición de servicios que reciben un embrión incrementa la tasa de preñez.

OBJETIVOS

Verificar si la transferencia de un embrión, previamente congelado, en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, en vacas con síndrome de repetición de servicios previamente inseminadas, mejora el índice de concepción.

Determinar si el índice de gestación se incrementa al administrar meglumina de flunixin en la transferencia embrionaria a vacas con síndrome de repetición de servicios previamente inseminadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación fue realizada en el período comprendido entre noviembre de 2001 y marzo de 2003 en tres establos de ganado bovino productores de leche localizados en Teoloyucan, Texcoco, Estado de México y Atitalaquia, Hidalgo. El clima de la región es Cb (wl) (w) (i') g templado con verano fresco largo entre 12° y 18° anual en el mes más frío, con oscilación de temperaturas medias mensuales entre 5° y 7° y una precipitación del mes más seco menor de 40 mm y por lo menos 400 mm de lluvia en el mes más húmedo³⁴

Embriones

Se utilizaron 30 embriones F1 (Holstein Friesian x Brahman)⁷, recuperados por el método no quirúrgico descrito por Elsdén³⁵, 24 embriones fueron congelados con etilenglicol y 6 con glicerol siguiendo las técnicas descritas por Mier³⁶. Se utilizaron embriones F1 para poder diferenciarlos de los de la raza Holstein al momento del nacimiento.

Selección de animales

Se utilizaron 45 vacas de la raza Holstein Friesian, con un mínimo de un parto, más de tres servicios infértiles, clínicamente sanas, sin anomalías en el aparato reproductor detectadas a la palpación vía rectal y con ciclos estrales de duración normal. Los animales presentaron una condición corporal entre 3 y 3.5 puntos (Escala 1 – 5, donde: 1 = caquéxica, y 5 = obesa). Todas las hembras se encontraban lactando y se mantuvieron bajo un sistema de producción intensivo, con dos ordeños al día.

⁷ Los embriones fueron donados por el Departamento de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM

Se formaron tres grupos al azar de 15 animales cada uno, en cada rancho se encontraban 5 animales representativos de cada grupo.

Distribución de tratamientos

Grupo A (Testigo): 15 vacas con 1.9 ± 1.2 partos (P) (media desviación estándar) y 4.53 ± 2 servicios infértiles (SI), las cuales fueron inseminadas con semen congelado proveniente de un toro de raza Holstein Friesian, 12 a 16 horas después de detectado el estro natural.

Grupo B (Tratamiento 1): 15 vacas, con 2.2 ± 1.2 P y 4.8 ± 0.86 SI, las cuales fueron inseminadas con semen congelado proveniente de un toro Holstein Friesian, 12 a 16 horas después de detectado el estro natural. (día cero). A estas hembras se les transfirió un embrión al 7º (mórula o blastocito) u 8º día (blastocito expandido), por el método no quirúrgico, en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo,.

Grupo C (Tratamiento 2): 15 vacas con 2.13 ± 1.12 P y 3.5 ± 0.51 SI, las cuales fueron inseminadas con semen congelado proveniente de un toro de la raza Holstein Friesian, 12 a 16 horas después de presentado el estro natural (día cero). Al séptimo u octavo día se les administraron 500mg de Meglumina de flunixin (10 ml, IM)^{*}, 2 a 5 minutos después se les transfirió un embrión en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, mediante el método no quirúrgico.

Todas las transferencias fueron realizadas por el mismo técnico experimentado.

Descongelamiento del embrión y transferencia directa (no quirúrgica)

En 24 embriones congelados con etilenglicol se siguió el procedimiento siguiente: Cada pajilla de 0.25 ml conteniendo un embrión se descongeló durante 15 segundos en el aire y 15 segundos en baño maría a 32 °C. Se secó la pajilla, se cortó el extremo sellado y se montó en una pistola de transferencia embrionaria (IMV – Francia), protegida

^{*} Finadyne®0, Schering-Plough, México, D.F.

con una camisa sanitaria. A las hembras receptoras se les aplicó anestesia epidural, para evitar las contracciones del recto durante la manipulación del aparato genital. La pistola se llevó hasta el último tercio del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, depositando el embrión en ese sitio.

Todo el procedimiento se realizó en menos de 5 minutos (transferencia directa).

En 6 embriones (blastocitos expandidos), congelados con glicerol, se siguió la técnica de descongelación en un paso; cada pajilla de 0.25 ml se descongeló durante 10 segundos en el aire y 30 segundos en baño maría a 35 °C, posteriormente se colocó el embrión en una solución 0.1 molar de sucrosa en medio PBS (medio de manejo) durante 10 minutos, para hidratarse, posteriormente el embrión fue colocado en una pajilla de 0.25 ml y se siguió el mismo procedimiento no quirúrgico antes descrito.

Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación se llevó a cabo por palpación vía rectal entre los 45 a 50 días posteriores a la inseminación. En las vacas se continuó efectuando la detección de calores para determinar el número de ellas que retornaron a estro, así como el periodo en que ocurrió.

Análisis estadístico

Para comparar la tasa de gestación el grupo testigo con cada uno de los grupos tratados se usó la prueba de probabilidad exacta de Fisher, a través de una tabla de contingencia de 2 X 2³⁷.

RESULTADOS

El porcentaje de gestación en el grupo testigo fue de 46.6 % (7/15), 33.3 % (5/15) en el grupo B y 46.6 % (7/15) en el grupo C. En conjunto se observó un 42.2 % de fertilidad en vacas repetidoras.

En los resultados obtenidos al realizar la prueba de probabilidad exacta de Fisher no se encontró un efecto significativo ($P > 0.05$) sobre el índice de gestación entre el grupo A (testigo) al compararlo con el grupo B (Tratamiento 1), tampoco hubo diferencia entre el grupo A y el grupo C (Tratamiento 2).

El diagnóstico de gestación se describe a continuación para cada uno de los grupos:

En el grupo A el 46.6 % se diagnosticó como gestante y el 26.6 % como no gestante, mientras que un 26.6 % de los animales había retornado a estro en un periodo de 17 a 24 días después de haber sido inseminadas.

Para el grupo B, 33.3 % fueron diagnosticadas gestantes, el 20.0 % no gestantes, y fue el grupo que mostró la mayor incidencia de individuos que retornaron a estro con un 46.6 %. En el grupo C, el 46.6 % de gestantes, siendo el grupo con mayor proporción de no gestantes 40.0% y menor incidencia de individuos que retornaron a estro con un 13.3 %.

El 83.3 % (5/6) de vacas que se les transfirió un embrión congelado con glicerol se diagnosticaron gestantes; mientras que sólo el 29.2% (7/24) de las transferencias en las que los embriones fueron congelados con etilenglicol lograron establecer la gestación.

La raza y sexo de las crías nacidas se describe para cada uno de los grupos:

De las 7 gestaciones del grupo testigo nacieron cuatro machos y una hembra de la raza Holstein, una vaca abortó al tercer mes de gestación y otra al sexto mes de gestación.

Las crías nacidas para el grupo B fueron tres hembras y un macho de la raza Holstein, en este grupo una vaca tuvo problemas locomotores al tercer mes de gestación por lo cual se sacrificó.

En el grupo C nacieron cuatro machos y una hembra F1 así como dos macho Holstein, presentándose un parto gemelar; y una vaca no llevo a término la gestación, ya que aborto al 6º mes de gestación.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo el índice de gestación obtenido en los grupos (A: 46.6 %, B: 33.3 % y C: 46.6%) es similar o mayor al reportado en vacas repetidoras (34.6%)¹⁶ e incluso en vacas de primer servicio (34.4 %)^{18,38}. Sin embargo no se aprecia un efecto significativo en el índice de gestación de los grupos tratados, esto es contradictorio a lo que se esperaba.

No obstante en el grupo B se observa un índice de gestación similar al obtenido por Kuehner *et al.*²³, quienes realizaron un estudio en el cual se transfirió un embrión fertilizado *in vitro* a 114 vacas repetidoras, siete días después de haber sido inseminadas, y al comparar estadísticamente los índices de gestación de los animales en experimentación con los estimados en registros reproductivos de vacas repetidoras (20 % de fertilidad); apreciaron una diferencia significativa general al incrementar 14 % ($P < 0.05$) dicho índice, obteniendo un índice de fertilidad total de 34% en este tipo de vacas; lo que se aproxima al índice de fertilidad obtenido por el grupo B (33 %) en el presente experimento.

Como hallazgo mencionan que esta diferencia fue más evidente en la tasa de gestación de vacas repetidoras en su cuarto servicio (65 %). Asimismo, Durocher³ obtuvo resultados parecidos al realizar un estudio similar, en el cual menciona que el 73 % de las vacas necesitan por lo menos cuatro inseminaciones para gestarse.

Cabe mencionar que en dichos estudios^{3,23} se comparó el índice de gestación de vacas repetidoras obtenido de registros, lo que difiere del presente estudio en donde la comparación se realizó con un grupo testigo, el cual se encontraba bajo las mismas condiciones que los grupos tratados.

Por otra parte los resultados obtenidos respecto al índice de fertilidad del grupo C (46.6 %), en el cual se administró la meglumina de flunixin, no ejerció ningún efecto benéfico en

el porcentaje de gestación de las vacas tratadas en comparación con las del grupo testigo (46.6 %).

Es importante resaltar que Schirck *et al.*³³ realizaron una transferencia embrionaria posterior a la administración de meglumina de flunixin a vacas productoras de carne obteniendo una tasa de fertilidad del 70.4 % utilizando embriones congelados en etilenglicol; sin embargo, en el presente trabajo en el grupo C se transfirieron 11 embriones congelados en etilenglicol de los cuales solo 3 llevaron a cabo su implantación y desarrollo, por el contrario se transfirieron 4 embriones congelados en glicerol y el 100 % de ellos llevó a término su gestación.

No se descarta que los embriones congelados en etilenglicol tuvieran algún problema, pues el porcentaje de embriones que lograron llevar a cabo una gestación fue más bajo con respecto a los congelados con glicerol (29.2 y 83.3 %); cuando normalmente se reportan tasas de gestación similares de transferencias con embriones congelados con glicerol y etilenglicol (60 y 69 % respectivamente)³⁹.

Con respecto a lo anterior Hasler *et al.*⁴⁰ mencionan que las personas que realizan comúnmente transferencias embrionarias a menudo han notado que el etilenglicol es más tóxico que el glicerol; y un tiempo de exposición a etilenglicol mayor a 10 minutos puede afectar la viabilidad del embrión⁴¹; en el presente estudio los embriones permanecieron expuestos a etilenglicol 30 minutos, previa congelación, debido a que el número de embriones a congelar fue elevado. Aunque estos efectos no se han demostrado en estudios hechos con embriones descongelados y posteriormente cultivados, para ver los efectos de exposición a diferentes crioprotectores, no se descarta que dichos efectos existan, ya que las condiciones a las que se enfrenta el embrión después de una transferencia directa difieren a las del cultivo^{40,42}.

Por otra parte es probable que el uso de un antiinflamatorio no esterooidal en la

transferencia de embriones sólo muestra incremento significativo en el índice de fertilidad al utilizarlo en vacas de fertilidad normal productoras de carne y no en vacas repetidoras que se encuentran lactando.

Sin embargo, en el grupo C se logra apreciar una diferencia numérica con respecto al grupo B y el número de individuos que retornaron a estro fue menor que en los otros grupos (3/15), lo que hace suponer que de alguna manera, la mayoría de los embriones lograron llevar a cabo el reconocimiento materno de la gestación, pero no fueron capaces de implantarse o sufrieron mortalidad fetal temprana.

Odensvik et al.⁴³ administraron meglumina de flunixin en la transferencia asincrónica de embriones, consiguiendo disminuir notablemente la liberación de prostaglandinas durante el reconocimiento materno de la gestación. A pesar de la evidencia del desarrollo embrionario y la disminución en liberación de PGF_{2α} (medida a través de su metabolito) no se logró establecer la gestación.

En la oveja, la aplicación de la meglumina de flunixin ha logrado alargar la fase lútea del ciclo estral, pero sin aumentar la tasa de gestación ni la prolificidad de las ovejas empadradas. Tampoco fue capaz de aumentar los índices de preñez en ovejas receptoras de embriones⁴⁴.

No se sabe hasta que punto pudo haber afectado la administración de meglumina de flunixin al proceso de implantación de los embriones, debido a que es un inhibidor inespecífico de las prostaglandinas, las cuales juegan un papel muy importante en este proceso, pues se sabe que al bloquear su síntesis por medio de un inhibidor de las prostaglandinas (indometacin) en los primeros días de gestación, se inhibe o retarda la implantación en ratas, hámsteres y conejos, observando que los sitios de implantación aparecen más tarde y son más pequeños, afectando el desarrollo del embrión que también se ve retrasado⁴⁵.

Es importante mencionar que la nula diferencia encontrada entre grupos en este trabajo, aún cuando se esperaba un efecto sinérgico de la inseminación y el embrión transferido sobre el índice de gestación, no descarta su uso en vacas repetidoras ya que estas han demostrado ser capaces de mantener y llevar a término una gestación, logrando índices de fertilidad del 50 %²² y 70 %⁴⁶; con la discrepancia de que en esos trabajos no hubo una inseminación previa a la transferencia y en uno de ellos se administró un análogo de GnRH 5 días después de haber transferido el embrión²², mientras que en el otro las vacas no se encontraban lactando y se utilizó la técnica quirúrgica para la transferencia⁴⁶. Por otra parte Schrick⁷ menciona que para apreciar el efecto de la meglumina de flunixin es necesario un gran número de individuos, por lo que el tamaño de la muestra es probable no sea el adecuado para poder encontrar diferencias significativas entre los grupos.

Diskin y Sreenan⁴⁷ han observado que la frecuencia con la que se presenta la mortalidad embrionaria tardía o mortalidad fetal temprana es mínima en vaquillas (8 %), ya que ellos sacrificaron a los animales a diferentes periodos después de su inseminación. En el presente estudio el 28 % de las vacas no retornaron a estro y fueron diagnosticadas no gestantes al realizar el diagnóstico de gestación. En estos animales es difícil saber si el producto alargó la duración de la fase lútea y murió posteriormente, o si simplemente pudieron haber sido animales no detectados que presentarían estro silencioso⁴⁸.

Se presume que el 28 % total de las vacas en experimentación presentaron una mortalidad embrionaria temprana que ocurrió en los primeros días de gestación, ya que dichas vacas se reportaron en estro alrededor de los 17 y 24 días siguientes a la inseminación artificial mostrando un ciclo de duración fisiológica normal, lo que hace

⁷ Schrick FN, 2003; comunicación personal

suponer que la mortalidad embrionaria ocurrió entre de los días 0 y 16 de la gestación; en este caso el embrión no logró extender el intervalo de vida del cuerpo lúteo¹⁴, esto pudo ocurrir al retrasarse el grado de desarrollo necesario en el que el embrión sea capaz de secretar las sustancias que interactúan en el endometrio para desencadenar la cascada de eventos que conducen al reconocimiento materno de la gestación, o tal vez, no hubo el suficiente soporte fisiológico uterino para que se llevara a cabo la interacción materno embrionaria⁵.

Las tasas de mortalidad embrionaria temprana obtenidas en el presente estudio son menores a las encontradas por Sreenan y Diskin⁴⁷ en las cuales se denota un incremento entre los días 8 y 16 posteriores a la inseminación en donde reportaron una tasa de mortalidad de 34%.

Contrario a lo que se esperaba, el índice de preñez del grupo testigo fue excepcionalmente alto (46 %), resultado difícil de explicar.

Normalmente el índice de fertilidad se ve afectado por diversos factores como lo son la detección adecuada de estros. La falla en su detección es un factor muy importante ya que se ha demostrado que un gran número de vacas que son detectadas en estro no lo están o se encuentran gestantes⁴⁹; es decir que exhiben un comportamiento de celo sin estar fisiológicamente respaldado (animales concomitantes)⁵⁰, y son inseminadas, esto incrementa la mortalidad embrionaria temprana en un 17 %⁴⁹ y el número de vacas repetidoras en cada hato⁵¹.

Otros factores que afectan el índice de fertilidad son el tiempo a la inseminación, así como una adecuada técnica, calidad del semen, manejo de este, entre otros; lo cual se vuelve un esfuerzo diluido entre 365 días durante cada año; al realizar una investigación en vacas repetidoras en un determinado periodo, es posible que se haya logrado prestar mayor atención a cualquiera de estos factores incrementando así dicho índice.

En trabajos en los que las vacas normales inseminadas han recibido un embrión por transferencia los porcentajes de gemelos que se han alcanzado van de 60⁵² a 70 %⁵³, sin embargo cuando el mismo procedimiento se ha hecho en vacas repetidoras los partos gemelares han sido sumamente bajos (9.52%)²³, lo que significa que la pérdida de embriones o implantaciones sigue siendo mucho mayor en este tipo de animales subfértiles.

En este estudio, de 10 partos registrados en las vacas que recibieron un embrión extra solo uno fue gemelar (10 %), lo que sugiere que en las vacas repetidoras es más difícil que se lleve a cabo el desarrollo hasta el parto de los dos embriones.

De todas las vacas que recibieron un embrión F1 por transferencia, 6 fueron Holstein, producto de la inseminación artificial, y 5 F1 (Holstein X Brahman); aunque no existieron diferencias en el tipo de embrión que se desarrollo hasta el parto, los resultados son contradictorios a lo esperado, pues los embriones F1, por ser híbridos se pensaba que tuvieran mayor capacidad para desarrollarse. En relación a este punto Kuhener et al.²³ sugieren que el embrión transferido es capaz de reforzar la señal que conduce al establecimiento de la gestación del embrión nativo sin que muestre mayor capacidad para implantarse.

Por último es importante mencionar que existen diversos factores que deben tomarse en cuenta antes de eliminar a este tipo de vacas del hato, pues se ha demostrado que de un 67 a 73 % de vacas repetidoras no lo son en subsiguientes lactaciones⁵⁴, lo que nos alienta a buscar alternativas.

LITERATURA CITADA

- 1 Lucy MC.. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: when will it end?. *Journal of Dairy Science* 2001;84:1277-1293
- 2 Hernández CJ, Gutiérrez AC. Un enfoque nacional de la problemática de la baja fertilidad en el ganado lechero. 1er simposio Nacional de Infertilidad en la Vaca Lechera. "9 y 30 de Noviembre 2001, Zacatecas, Zac. 1-12
- 3 Durocher J. Approche des problèmes de fertilité chez les bovins laitiers. *Agri-Vision* (Serial online) Cited 2000 Nov 16. Available from: <http://www.agr.gouv.qc.ca/dgpar/sites/r16e/agrivi/agrivi00>
- 4 Porras AAI. Infertilidad en la hembra bovina (Síndrome de la vaca repetidora de estros o servicios). En: *Mejoramiento Animal, Reproducción Bovinos*. 2ª ed. México: SUA, 2000:99-106
- 5 Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG. Embryo survival rate in cattle: a mayor limitation to the achievement of high fertility. *British Society of Animal Science* 2001;26:93-104
- 6 Bascom SS and Young AJ. A summary of the reasons why farmers cull cows. *Journal of Dairy Science*. 1998;81:2299-2305
- 7 Almeida PLA. Early embryo mortality in "Repeat-breeder" cows. *Ars Veterinaria* 1995;11:18-34
- 8 Linares T. Embryonic development in repeat breeder and virgin heifers seven days after insemination. *Animal Reproduction Science*, 1981/1982;4:189-198
- 9 De la Fuente J, Monge A, Cocero MJ, Barragan C. Evaluación de la mortalidad embrionaria en vacas repetidoras de celos, a través de su producción embrionaria. *Invest. Agr.:Prod.Sanid.anim* 1988;3:183:192
- 10 Gustafsson K, Larsson K. Embryonic mortality in heifers after artificial insemination and embryo transfer: differences between virgin and repeat breeder heifers. *Research in veterinary science* 1985;39:271-274

- 11 Morales R, Hernández CJ. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat breeding dairy cows. *Theriogenology* 2001;55:1831-1841
- 12 Wilmut I, Sales DI, Ashworth CJ. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *Journal of Reproduction and Fertility* 1986;76:851-864
- 13 Ayalon N. A review of embryo mortality in cattle. *Journal of reproduction and fertility*. 1978;54:483-493
- 14 Kastelic J.P, Northey DL, Ginther OJ. Spontaneous embryonic death on days 20 to 40 in heifers. 1991;35:351-363
- 15 Zavy TM, Geisert DR. *Embryonic Mortality in domestic Species*.ed. CRC. Florida, Ca. 1994
- 16 Swanson LV, Young AJ. Failure of gonadotropin-releasing hormone or human chorionic gonadotropin to enhance the fertility of repeat-breeder cows when administered at the time of insemination. *Theriogenology* 1990;34:955-963
- 17 Zarco L, Balcazar S, MejíaV. Infertilidad debida a la asincronia materno embrionaria en rumiantes; Memorias del 6° Curso Internacional de Reproducción en Bovinos; 1995 mayo 8-11. Academia de investigación en Biología de la Reproducción, 1995:107-115
- 18 Morales RS, Hernández CJ, Rodríguez TG, Peña FR. Comparación del porcentaje de concepción y la función lútea en vacas de primer servicio, vacas repetidoras y vaquillas Holstein. *Veterinaria México* 2000;31:179-184
- 19 Hernández CJ, Morales RS. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Veterinaria México* 2001;32:279-287
- 20 Goodman RL, Karsch FJ. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: diferencial supresion by ovarian steroids. *Endocrinology* 1980;107:128
- 21 Robinson NA, Keneth E, Leslie E, Walton JS. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 1989;72:202-207
- 22 Dawson J. Embryo transfer used to successfully treat repeat breeder cows. *Memories of XIX World Buiatrics Congress*; 1996 July 8-12; Edinburgh, United Kindom: British Cattle

- Veterinary Association. 1996:257-259
- 23 Kuehner LF, Hill BR, Gwyn C. In vitro derived embryos as a means of improving fertility in low conception rate cattle: a field study. *Theriogenology*. 1997;47:367
- 24 Kerbler T.L. Buhr M, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology*. 1997;47:703-714
- 25 Hernandez CJ. Fertilización y desarrollo embrionario. En: *Mejoramiento Animal, Reproducción Bovinos*. 2ª ed. México: SUA, 2000:44
- 26 Roberts MR, Tammie SF, Harriet F, Keisler D. Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. *Theriogenology*. 1990;33:175-183
- 27 Hansen TR, Austin KJ, Perry DJ, Pru JK, Texeira MG, Jonson GA. Mechanism of actino of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 1999; suppl. 54:329-339
- 28 Hansen JP. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology*;47:121-130
- 29 Asselin E, Bazer WF, Fortier AM. Recombinant ovine and bovine interferons Tau regulate prostaglandin production and oxytocin response in cultured bovine endometrial cells. *Biology of Reproduction*. 1997;56:402-408
- 30 Schallenberger E, Schams D, Meyer HHD. Sequences of pituitary, ovarian and uterine hormone secretion during the first 5 weeks of pregnancy in dairy cattle. *J. of Reproduction and Fertility* 1989;37 (Suppl):277-286
- 31 Seals RC, Hopkins FM, Schrick FN. Effect of prostaglandin F2 α on embryonic survival in cattle 1996;54(Suppl 1):82
- 32 Hockett ME, Rohrbach NR, Schrick FN. Effect of administration of PGF2 α on embryonic development and quality in cows supplemented with exogenous progestogen. *J. of Animal Science* 1998;81(suppl 1):241
- 33 Schrick FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Wert NE, Wherman ME. Administration of a prostaglandin inhibitor immediately prior to embryo transfer improves pregnancy rates in

- cattle. *Theriogenology* 2001;55:370.
- 34 García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Copen. 4ª ed. México: Indianapolis 30, 1987
- 35 Elsden RP, Seidel GE. Procedures of recovery, bisection, freezing and transfer of bovine embryos. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University;1985.
- 36 Mier FJR. Estudio comparativo de dos métodos de congelación de embriones bovinos desarrollados in vitro (Tesis de maestría). México (D.F.):UNAM,1993.
- 37 Zar HJ Bioestadistical Análisis. 3rd ed. New Jersey: Prentice Wall, Inc, 1996
- 38 Aréchiga CF, Ortiz O, Hansen PJ. Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. *Theriogenology*;1994;41:1251-1258
- 39 Dochi O, Imai K, Takakura H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Animal Reproduction Science* 1995;38:179-185
- 40 Hasler JF, Hurtgen PJ, Stokes JE, Jin ZQ. Influence of time of exposure to glycerol or ethylene glycol on the survival of frozen-thawed bovine IVF embryos 1996;45:172
- 41 Looney CR, Broek DM, Gue CS, Funk DJ, Faber DC. Field experiences with bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol 1996;45:170
- 42 Hasler JF, Hurgun PJ, Jin ZQ, Stokes JE. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* 1997;48:563-579
- 43 Odensvik K, Gustafsson H. Effect of flunixin during asynchronous embryo transfer in the heifer. *Animal Reproduction Science* 1994;36:13-24
- 44 Aké R. Efecto del flunixin meglumine en el ciclo estral y la fertilidad de ovejas Pelibuey bajo condiciones de tropico. Tesis de doctorado. Universidad de Colima. (2000)
- 45 Knobil E, Neil JD. The physiology of reproduction. Seven Edition. Raven Press.Ltd., New York 1994.
- 46 Tanabe TY, Hawk HW, Hasler JF. Comparative fertility of normal and Repeat-breeding cows as embryo recipients. *Theriogenology*1985;23:687-696
- 47 Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility* 1980;59:463-468

- 48 Sreenan JM, Beehnen D, Mulvehill P. Egg transfer in the cow: Factors affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfers. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975;44:77-85
- 49 Sturman H, Oltenucu EAB, Foote RH. Importance of inseminating only cows in estrus. *Theriogenology* 2000;53:1657-1667
- 50 Verduzco GRA. Momento de ovulación y presentación de estro en vacas *Bos indicus* sincronizadas de manera escalonada con un progestágeno sintético (Norgestomed). Tesis de licenciatura. UNAM (2001)
- 51 O'Farrel KJ, Langley OH. Fertilisation and embryonic survival rates in dairy cows culled as repeat breeders. *The Veterinary Record* 1983;29:95-97
- 52 Sreenan JM, Mc Donagh. Comparison of the embryo survival rate in heifers following artificial insemination, non surgical blastocyst transfer or both. *Journal of Reproduction and Fertility* 1979;56:281-284
- 53 Anderson GB, Cupps PT, Drost M. induction of twins in cattle with bilateral and unilateral embryo transfer. *Journal of Animal Science* 1979;49:1037-1042
- 54 Brooks G. Fertility of repeat breeder cows in subsequent lactations. *The Veterinary Record* 1998;28:615-616