






Fisiología animal

Artículo de investigación científica y tecnológica

Efecto de la progesterona plasmática en la competencia para el desarrollo embrionario *in vitro* de vacas *Bos taurus taurus* y *Bos taurus indicus*

Effect of plasma progesterone on competition for *in vitro* embryonic development of *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cows

 Héctor Javier Narváez ^{1*}  Reginaldo da Silva Fontes ²  Bruno Campos de Carvalho ³
 Raquel Varella Serapião ⁴  Clara Slade Oliveira ³ Agostinho Jorge dos Reis Camargo ⁵

¹ Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia

² Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Brasil

³ Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil

⁴ Universidade de Vassouras, Vassouras, RJ, Brasil

⁵ Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Vassouras, Brasil

*Autor de correspondencia: Universidad de Santander, Facultad de Ciencias Agrícolas y Veterinarias, Programa de Medicina Veterinaria, Calle 70 N° 55-210, Bucaramanga, Colombia. Clínica Veterinaria. h.narvaez@mail.udes.edu.co

Recibido: 21 de mayo de 2020
Aprobado: 30 de noviembre de 2021
Publicado: 31 de mayo de 2022

Editor temático: José Guillermo Velásquez Penagos, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA], Villavicencio, Meta, Colombia.

Para citar este artículo: Narváez, H. J., Fontes, R. S., Carvalho, B. C., Serapião, R. V., Oliveira, C. S., Camargo, A. J. R. (2022). Efecto de la progesterona plasmática en la competencia para el desarrollo embrionario *in vitro* de vacas *Bos taurus taurus* y *Bos taurus indicus*. 23(2), e2003. https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num2_art:2003

Resumen: Diversos estudios han comprobado que la progesterona tiene un efecto directo en la calidad ovocitaria y el desarrollo inicial embrionario. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la concentración de la progesterona (P4) plasmática en el desarrollo de embriones *in vitro* en vacas de raza *Bos taurus taurus* (Holstein) y *Bos taurus indicus* (Gyr). Se utilizaron vacas Holstein y Gyr multíparas, presincronizadas con la aplicación de dos dosis de D-cloprostenol con intervalo de once días. Posteriormente, se distribuyeron en uno de tres grupos experimentales inducidos a diferentes niveles plasmáticos de progesterona. El grupo control fue sincronizado utilizando únicamente D-cloprostenol sin progesterona exógena, el grupo progesterona baja recibió un implante auricular de norgestomet de segundo uso y al grupo progesterona alta se le aplicaron dos implantes auriculares de norgestomet nuevos. Los resultados evidencian que la concentración plasmática de progesterona fue significativamente diferente ($P < 0,05$) tanto para las vacas Holstein ($0,22 \pm 0,15$, $2,23 \pm 0,17$ y $5,32 \pm 0,22$ ng/mL) como para las vacas Gyr ($0,24 \pm 0,19$, $2,05 \pm 0,17$, $4,85 \pm 0,20$ ng/mL) entre los grupos control, progesterona baja y progesterona alta, respectivamente. Las vacas Gyr presentaron diferencia ($P < 0,05$) en la tasa de clivaje del grupo progesterona baja en relación con los grupos control y progesterona alta ($87,9 \% \pm 0,11$ vs $77,5 \% \pm 0,13$ y $76,4 \% \pm 0,10$, respectivamente) y en la variable tasa de blastocistos del grupo progesterona baja ($48,3 \% \pm 0,16$) en relación con el grupo control ($35,8 \% \pm 0,10$) y el grupo progesterona alta ($30,4 \% \pm 0,20$). Se concluye que la progesterona tuvo efecto sobre el desarrollo embrionario en vacas de raza Gyr, el cual no se evidenció en las vacas de raza Holstein.

Palabras clave: aspiración folicular, ganado bovino, folículos ováricos, norgestomet, onda folicular, producción de embriones *in vitro*.

Abstract: Studies have shown that progesterone has a direct effect on oocyte quality and early embryonic development. The objective of this study was to evaluate the effect of plasma progesterone (P4) concentration on *in vitro* embryo development in *Bos taurus taurus* (Holstein) and *Bos taurus indicus* (Gyr) cows. Multiparous Holstein and Gyr cows were used, and they were presynchronized with the application of two doses of D-cloprostenol with an interval of 11 days. They were latter distributed in one of three experimental groups induced to different plasma levels of progesterone: control group was synchronized using only D-cloprostenol without exogenous progesterone, low progesterone group received an auricular implant of norgestomet of second use, and high progesterone group received two new auricular implants of norgestomet. The plasma progesterone concentration was significantly different ($P < 0.05$) for both Holstein cows (0.22 ± 0.15 , 2.23 ± 0.17 and 5.32 ± 0.22 ng/mL) and Gyr cows (0.24 ± 0.19 , 2.05 ± 0.17 , 4.85 ± 0.20 ng/mL) between control, low progesterone, and high progesterone groups respectively. Gyr cows presented differences ($P < 0.05$) in the cleavage rate of the low progesterone group in relation to the control and high progesterone groups ($87.9 \% \pm 0.11$ vs. $77.5 \% \pm 0.13$ and $76.4 \% \pm 0.10$, respectively) and in the variable blastocyst rate of the low progesterone group ($48.3 \% \pm 0.16$) in relation to the control group ($35.8 \% \pm 0.10$) and the high progesterone group ($30.4 \% \pm 0.20$). It is concluded that there is an effect of progesterone on embryonic development of Gyr cows. However, this effect is not evidenced in Holstein cows.

Keywords: cattle, follicular aspiration, follicular wave, *in vitro* embryo production, norgestomet, ovarian follicles.



Introducción

El uso de las biotecnologías de la reproducción asistida tiene como finalidad modernizar la industria ganadera mediante la multiplicación rápida de animales de alto valor genético, y ha sido la base fundamental de la pecuaria mundial (Moore & Hasler, 2017). Varios estudios han encontrado que diversos factores que afectan los programas de producción de embriones *in vitro* son determinantes de los buenos resultados de dichos procesos (Al-Katanani et al., 2002; Boediono et al., 1995; De Wit et al., 2000; Parrish et al., 1995; Pavlok et al., 1992; Snijders et al., 2000; Torres-Júnior et al., 2008).

La progesterona (P4) tiene un papel importante en la reproducción bovina. Inicialmente fue descrita por Fonseca et al. (1983), quienes evaluaron elevadas concentraciones de la hormona doce días antes de la inseminación artificial e identificaron que tiene una relación con altas tasas de concepción en vacas lecheras. No obstante, se han realizado pocos trabajos que indiquen el efecto de la progesterona plasmática en la calidad ovocitaria y el desarrollo embrionario *in vitro*. Según Lonergan y Sánchez (2020), aunque la función de la progesterona en la calidad ovocitaria y el desarrollo embrionario no está completamente esclarecido, se considera que tiene un efecto directo en la calidad de los ovocitos, el desarrollo inicial embrionario y fetal, el mantenimiento de la fase lútea y la composición del líquido uterino.

Asimismo, un resultado previo indicó que la administración exógena de progesterona o progestágenos aplicados antes de la aspiración folicular mejoró la competencia para el desarrollo de los ovocitos y la producción de embriones *in vitro* (Pfeifer et al., 2009). Por su parte, Pirestani et al. (2011) indicaron que la presencia del cuerpo lúteo en el momento de la aspiración folicular no está necesariamente asociada al mejoramiento de la calidad ovocitaria, sino al mejoramiento de la competencia de los ovocitos para la obtención y desarrollo de embriones *in vitro*.

También se ha observado que una mayor concentración plasmática de progesterona mejora el tamaño embrionario y por ende la tasa de gestación (Lonergan, 2011; Lonergan & Sánchez, 2016; Lonergan, Forde et al., 2016; Lonergan, Woods et al., 2007). En contraste, se determinó que bajos niveles de progesterona incrementan la frecuencia de los pulsos de la hormona luteinizante (LH), estradiol, hormona del crecimiento (GH), la insulina y el factor de crecimiento similar a insulina -1 (IGF-1), aspectos relacionados con la proliferación celular, la esteroidogénesis, el crecimiento folicular, la calidad ovocitaria (El-Sherry et al., 2010) y la reserva ovárica (Evans et al., 2012). Por último, Saad et al. (2019) concluyeron que en ovocitos oriundos de vacas *Bos taurus indicus* cíclicas, la progesterona ejerce un efecto positivo sobre la calidad ovocitaria, pues mejora las tasas de clivaje y de embriones en relación con vacas acíclicas. Adicionalmente, en vacas *Bos taurus taurus*, Abreu et al. (2018) concluyeron que la progesterona en concentraciones altas o bajas no presenta efecto sobre el mejoramiento de la calidad ovocitaria.

Específicamente, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la progesterona plasmática en la competencia para el desarrollo de embriones *in vitro* en vacas *Bos taurus taurus* (Holstein) y *Bos taurus indicus* (Gyr).

Materiales y métodos

El estudio se desarrolló con base en los siguientes criterios: brindar los cuidados adecuados a los animales según su etología, evitando dolor innecesario, sufrimiento, estrés o lesiones prolongadas. Así mismo, evitando la duplicación o repetición innecesaria de experimentos y reduciendo al mínimo indispensable el número de animales para garantizar la validez de la investigación (Garcés & Giraldo, 2012).

Selección de los animales y lugar

Se utilizaron doce vacas multíparas (Holstein, $n = 6$, $567 \text{ kg} \pm 43$ y Gyr, $n = 6$, $473 \text{ kg} \pm 51$), no lactantes, no gestantes, con edades entre los 4 y los 8 años. Todos los animales fueron mantenidos con pasturas a base de *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria brizantha*, con suplementación mineral (60 g/día/vaca) y agua *ad libitum*. El estudio fue realizado en condiciones tropicales con temperatura y precipitación promedio anual de 22 °C y 1.163 mm, respectivamente.

Diseño experimental

Las hembras de ambas razas fueron distribuidas en tres grupos experimentales: grupo control, progesterona baja y alta. Para remover el efecto animal sobre los resultados, todas las vacas pasaron por los tres tratamientos. A cada grupo experimental le fueron realizadas tres repeticiones y el intervalo entre aspiraciones fue de 22 días. Antes de cada aspiración folicular, los animales fueron sometidos a un nuevo protocolo hormonal para sincronizar la onda folicular.

Protocolo de sincronización de la onda folicular

Los animales del estudio fueron previamente sometidos a una sincronización exclusivamente con dos aplicaciones de 150 µg de D-cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec Ltda., Brasil), en intervalo de once días, con el objetivo de eliminar la síntesis y la secreción de progesterona endógena mediante la regresión del cuerpo lúteo. Tres días después las vacas se asignaron a uno de tres grupos experimentales:

1. Grupo control (3 sesiones de aspiración folicular guiada por ecografía (OPU)): las donadoras de este grupo fueron sometidas a niveles subluteales ($< 1 \text{ ng/mL}$) de progesterona plasmática, motivo por el cual no recibieron implante auricular de norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil) y recibieron una tercera dosis de D-cloprostenol tres días antes de la OPU.
2. Segundo grupo experimental (progesterona plasmática baja): se realizaron tres sesiones de OPU con los animales y recibieron un implante auricular de norgestomet de segundo uso.
3. Tercer grupo experimental (progesterona plasmática alta): se realizaron tres sesiones de OPU con los animales y recibieron dos implantes auriculares de norgestomet nuevos.

El protocolo de sincronización de la onda folicular fue complementado con la administración de 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE[®], Tecnopec Ltda., Brasil). Los implantes auriculares de norgestomet fueron removidos 24 horas después de la aspiración folicular, momento en el cual se inició un nuevo protocolo hormonal.

Aspiración folicular guiada por ecografía

La OPU se realizó siete días después del inicio del protocolo de sincronización en folículos con un diámetro de ≥ 3 mm a 9 mm. Para ello se utilizó una aguja desechable de 20 “G” (WTA-Vet, Brasil), acoplada a una línea de teflón con presión negativa de 70 mm/Hg; Previamente a la aspiración, se aplicó anestesia epidural (0,2 mg/kg de Bloc® J. A. Saúde Animal, Brasil) entre la última vértebra sacra y la primera coccígea, y se contaron los folículos de ambos ovarios con ayuda de un ecógrafo (Mindray, DP 2200 VET, China), equipado con transductor microconvexo de 7,5 MHz de frecuencia, acoplado a una guía transvaginal para aspiración folicular.

Se empleó un tubo cónico de 50 mL con 5 mL de D-PBS (D-PBS®, Vitrocell, Brasil), suplementado con 0,1 % de heparina (Liquemine®, Roche, Brasil) y 1 % de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), en cada animal para coleccionar el fluido folicular y los ovocitos. Una vez coleccionado el líquido folicular, fue transferido a un filtro EmCon (Agtech, USA), adicionando 100 mL de D-PBS para remover los coágulos y las células. Las estructuras restantes CCO (complejos cúmulos-ovocitos) fueron lavadas en TCM 199 tamponado con HEPES (TCM-199; Gibco BRL, Grand Island, NY) más 10 % de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de piruvato sódico y 83,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amicacina (Instituto Bioquímico, Río de Janeiro, Brasil). Se consideraron ovocitos viables para maduración *in vitro* los CCO grado I (tres o más capas de células del cúmulo) y II (dos capas de células del cúmulo), clasificados de acuerdo con la cantidad de células del cúmulo y aspecto homogéneo del citoplasma. La clasificación de los CCO fue realizada conforme a lo descrito por Sato et al. (1990).

Maduración *in vitro*

Los CCO viables fueron madurados durante 24 horas en medio TCM 199, suplementado con HEPES (25 mM), 10 % de SFB, 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil), 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estradiol, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de piruvato sódico, ITS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina - transferrina - selenio), 83,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amikacina y cubiertos con aceite mineral estéril (Sigma-Aldrich Co, Estados Unidos). Las condiciones atmosféricas fueron 38,7 °C, 6 % de CO₂, 5 % de O₂ y 89 nitrógeno.

Fertilización *in vitro*

Después de la maduración, los ovocitos fueron sometidos a fertilización *in vitro* durante 15 a 18 horas. Fue utilizado medio FERT-TALP suplementado con 0,6 % de BSA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de heparina, 18 μM de penicilamina, 10 μM de hipotaurina, 1,8 μM de epinefrina y cubiertos con aceite mineral estéril.

Las pajillas utilizadas para la fertilización *in vitro* fueron descongeladas a 35 °C durante 30 segundos, y el contenido fue vertido cuidadosamente sobre el gradiente de Mini - Percoll 45 / 90. La dosis inseminante para cada gota fue de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL. El semen de la raza Gyr fue utilizado para fertilizar los ovocitos de las vacas Holstein, y el semen de Holstein fue usado para fecundar los ovocitos de las vacas Gyr. Este protocolo de fertilización se realizó con la finalidad de obtener embriones F1.

Cultivo *in vitro*

Después del periodo de fertilización, los presuntos cigotos fueron transferidos separadamente por donadora a gotas de 100 μ L de medio SOF, suplementado con 2,5 % de SFB, 6 mg/mL de BSA, 16 μ g/mL de piruvato sódico, 83,4 μ g/mL de amikacina, 2,8 mM de mioinositol, 340 μ M de citrato de trisodio dihidratado y recubiertas con aceite mineral estéril durante siete días. Cada 48 horas el medio fue removido y sustituido el 50 % del volumen de cada gota. A las 72 a 96 horas posfecundación se evaluó la tasa de clivaje con la formación de dos células. Los embriones fueron clasificados según la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (Stringfellow & Givens, 2010).

Concentración de progesterona exógena en sangre

Para hacer la cuantificación plasmática de progesterona se colectaron muestras de 5 ml de sangre de la vena coccígea en el día de la aspiración folicular. Las muestras fueron centrifugadas a 3.000 G durante veinte minutos. Una vez obtenido el plasma, este fue almacenado en criotubos hasta su utilización. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Reproducción y Mejoramiento Genético Animal de la Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, Río de Janeiro, Brasil), mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIE) en fase sólida, para lo cual se empleó el kit comercial Coat-A-Count[®] 17 α -OH Progesterone (Siemens, Los Ángeles, EE. UU.). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la metodología propuesta por el fabricante. Específicamente, se hicieron tres ensayos, cada uno con sensibilidad de 0,03 ng/mL. El coeficiente de variación interensayo fue de 4,1 % y los coeficientes de variación intraensayos fueron de 5,4 %, 4,3 % y 4,9 %, para los ensayos 1, 2 y 3, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en el software Statgraphics Centurion XVIII. Para la concentración plasmática de la progesterona, la tasa de recuperación, la tasa de ovocitos viables, la tasa de clivaje y la tasa de blastocistos se calcularon las medias y la desviación estándar (DE), y se compararon usando ANOVA de una sola vía después de realizar pruebas de normalidad para el cumplimiento de dicho supuesto. Variables con efecto significativo ($P < 0,05$) fueron comparadas por el método LSD de Fisher.

Resultados y discusión

En la figura 1 se presenta la concentración plasmática de la progesterona en las vacas Holstein: grupo control ($0,22 \pm 0,15$ ng/mL), progesterona baja ($2,23 \pm 0,17$ ng/mL) y progesterona alta ($5,32 \pm 0,22$ ng/mL), $P < 0,05$ entre grupos. Esta misma tendencia se presentó en los grupos de las vacas Gyr: grupo control ($0,24 \pm 0,19$ ng/mL), grupo progesterona baja ($2,05 \pm 0,17$ ng/mL) y grupo progesterona alta ($4,85 \pm 0,20$ ng/mL). Además, en ambos grupos genéticos se observó durante todo el período experimental ausencia de ovulación y formación del cuerpo lúteo.

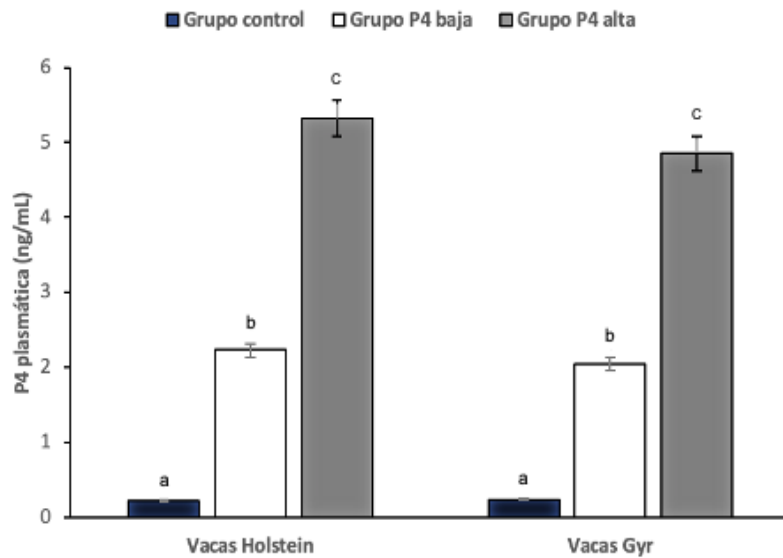


Figura 1. Concentración de progesterona plasmática (ng/mL) en vacas Holstein y Gyr. a, b y c = Grupo racial con letras minúsculas distintas difieren entre sí ($P < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados fueron semejantes a estudios anteriores, los cuales indicaron alta eficiencia del norgestomet en la supresión del comportamiento del estro y de la ovulación (Kesler, Dyson et al., 1997; Kesler, Favero, et al., 1995; Machado & Kesler, 1996; McGuire et al., 1990). Según Wishart (1972), revisado por Machado y Kesler (1996), fueron necesarios diariamente 137 a 140 μg de norgestomet o 45 mg de progesterona para suprimir la manifestación del estro en novillas *Bos taurus taurus*, motivo por el cual los autores sugieren que el norgestomet es 321 veces más potente que la progesterona natural. Un estudio posterior constató que los receptores de la progesterona presentaron mayor afinidad de unión al norgestomet en relación con la progesterona endógena (14,2 % vs 1,1 %, respectivamente) (Perry et al., 2005).

Existen muy pocos estudios relacionados con el uso de implantes auriculares de norgestomet de segundo uso. No obstante, Maluf et al. (2010) y Uribe et al. (2013) concluyeron que las tasas de gestación no son afectadas en vacas cebuinas cuando son sincronizadas con implantes auriculares de norgestomet de segundo uso.

En cuanto a la concentración de la progesterona del presente estudio, los resultados fueron semejantes a los descritos por Santiago et al. (2001) y Adams et al. (2008), cuyos trabajos determinaron que los niveles de esta hormona desde el día del estro, hasta el tercer día del ciclo estral, fueron menores a 1 ng/mL, momento desde el cual se eleva hasta alcanzar niveles superiores a 4 ng/mL el 14.º día del ciclo estral. De manera similar, Cerri et al. (2011) confirmaron estos hallazgos en vacas Holstein en lactación. No obstante, estos mismos autores presentaron niveles plasmáticos similares entre los grupos progesterona baja y alta, lo cual diverge de los resultados de la presente investigación, pues se observó mayor concentración ($P < 0,05$) para el grupo de progesterona alta en comparación con el de progesterona baja en ambos grupos raciales.

Paralelamente, otro estudio constató niveles de progesterona menores a 0,5 ng/mL durante el protocolo de sincronización en animales con ausencia de cuerpo lúteo, y en aquellos con presencia de dicha estructura la concentración plasmática fue superior a 2 ng/mL (El-Sherry et al., 2010). Estos hallazgos fueron concurrentes con los de este trabajo, según los cuales las hembras del grupo control que fueron

inducidas a la ausencia del cuerpo lúteo presentaron niveles subluteales de progesterona (< 1 ng/mL). Recientemente, Saad et al. (2019), en concordancia con el actual estudio, obtuvieron niveles de progesterona mayores en vacas *Bos taurus indicus* cíclicas respecto de los animales en estado acíclico ($4,2 \pm 0,4$ vs $0,5 \pm 0,2$ ng/mL, respectivamente).

Los valores que se presentan en la tabla 2 evidencia que las vacas de raza Holstein no presentaron efecto ($P > 0,05$) sobre las variables tasa de recuperación, tasa de ovocitos viables, tasa de clivaje y tasa de blastocistos.

Tabla 2. Efecto de la progesterona plasmática sobre la tasa de recuperación de ovocitos, la tasa de ovocitos viables, la tasa de clivaje y la tasa de blastocistos en vacas de raza Holstein

	Vacas Holstein			
	Tasa de recuperación (%)	Tasa de ovocitos viables (%)	Tasa de clivaje (%)	Tasa de blastocistos (%)
Grupo control	$53,0 \pm 0,25$	$74,5 \pm 0,18$	$71,4 \pm 0,18$	$30,9 \pm 0,27$
Grupo P4 baja	$53,4 \pm 0,24$	$65,3 \pm 0,23$	$76,3 \pm 0,16$	$38,2 \pm 0,32$
Grupo P4 alta	$53,3 \pm 0,22$	$64,2 \pm 0,19$	$67,0 \pm 0,27$	$29,1 \pm 0,33$

Los datos están descritos como media \pm DE.

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados son consistentes con los presentados por Abreu et al. (2018), quienes obtuvieron concentraciones altas o bajas de progesterona en donadoras *Bos taurus taurus* antes de la OPU, sin presentar efecto sobre la calidad ovocitaria.

Es importante indicar que, en condiciones tropicales, el estrés calórico puede generar en este tipo de razas baja calidad de los ovocitos y baja producción de embriones de origen *in vitro* e *in vivo*. Si bien es cierto que en el actual estudio no se evaluó el efecto de la temperatura ambiental sobre el desempeño de las hembras Holstein, un estudio reciente fue concluyente en resaltar que la calidad de los ovocitos, el desarrollo embrionario y las tasas de gestación sí son afectadas notablemente por el estrés calórico en donadoras de este grupo genético (Oliveira et al., 2019).

Otro aspecto clave en los programas de producción de embriones *in vitro* en *Bos taurus taurus* está relacionado con el día de la aspiración folicular: en este trabajo la técnica se aplicó tres días después de la emergencia de la nueva onda folicular. Según Ferreira et al. (2009) y Gimenes (2010), la asociación del norgestomet y del benzoato de estradiol inducen a la emergencia de una nueva onda folicular aproximadamente cuatro días después del inicio del protocolo hormonal. Por lo tanto, se considera que el mejor momento para la aspiración oscila entre el segundo y quinto día después de la emergencia de la nueva onda folicular (Hendriksen et al., 2004). En este mismo trabajo, los autores también indicaron que la mejor calidad ovocitaria de vacas Holstein la encontraron en ovarios que presentaron cuerpo lúteo menor a tres días de formación; no obstante, la presencia de un cuerpo lúteo funcional no mejoró la calidad de los ovocitos recuperados (Hendriksen et al., 2004).

Estas observaciones son semejantes a las realizadas en la actual investigación, en la cual se encontró que los diferentes niveles de la progesterona plasmática no influyeron la tasa de ovocitos viables, la tasa de clivaje ni la tasa de blastocistos. Esto confirma lo reportado por Chian et al. (2002) y Takuma et al. (2007), en el sentido de que la presencia del cuerpo lúteo en el momento de la aspiración folicular no tiene efecto sobre la producción de embriones *in vitro* en razas taurinas. Contrario a todas estas observaciones, Machatková et al. (2004) hallaron en bovinos de raza Holstein mayor producción de blastocistos en la fase de crecimiento folicular —con presencia de CL (24,3 %), respecto de la fase de dominancia folicular— sin CL (12,1 %).

Ahora bien, los resultados de las hembras de raza Gyr (tabla 3) evidencian que hay una diferencia ($P < 0,05$) entre los tratamientos en las variables tasa de clivaje y tasa de blastocistos del grupo progesterona baja, respecto de los grupos control y progesterona alta.

Tabla 3. Efecto de la progesterona plasmática sobre la tasa de recuperación de ovocitos, la tasa de ovocitos viables, la tasa de clivaje y la tasa de blastocistos en vacas de raza Gyr

	Vacas Gyr			
	Tasa de recuperación (%)	Tasa de ovocitos viables (%)	Tasa de clivaje (%)	Tasa de blastocistos (%)
Grupo control	46,8 ± 0,24	68,8 ± 0,23	77,5 ^b ± 0,13	35,8 ^b ± 0,10
Grupo P4 baja	59,4 ± 0,26	77,8 ± 0,14	87,9 ^a ± 0,11	48,3 ^a ± 0,16
Grupo P4 alta	64,1 ± 0,22	72,7 ± 0,09	76,4 ^b ± 0,10	30,4 ^b ± 0,20

Los datos están descritos como media ± DE.

^{a, b} Letras minúsculas distintas, en la misma columna, difieren entre sí ($P < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia.

A pesar de que en los resultados del presente trabajo no se observó efecto sobre la tasa de ovocitos viables para ninguno de los tres grupos (control, progesterona baja y alta), los niveles circulantes de progesterona en razas cebuinas sí presentan efecto directo sobre la calidad ovocitaria (Saad et al., 2019). Con base en esto se sabe que la frecuencia de la secreción pulsátil de la GnRH y de la LH es regulada por la progesterona, de manera que a menor concentración de progesterona durante la fase de crecimiento folicular, mayor es la frecuencia pulsátil de la LH (Fair & Lonergan, 2012). Como consecuencia, se considera que la LH es un promotor de la maduración y de la calidad ovocitaria (Chaubal et al., 2007).

Según Pfeifer et al. (2009), bovinos (*Bos taurus indicus* × *Bos taurus taurus*) que fueron sometidos a protocolos hormonales con bajos niveles plasmáticos de progesterona presentaron ovocitos de mejor calidad y mayor producción de embriones *in vitro*. Estos hallazgos son parcialmente similares a los del actual trabajo con las vacas Gyr, en los cuales el grupo de progesterona baja presentó mayor tasa de embriones en relación con los grupos control y progesterona alta. De acuerdo con esto, también es importante resaltar que las vacas Gyr que fueron tratadas para manifestar niveles subluteales de progesterona (grupo control) presentaron tasas óptimas de clivaje (Chauhan et al., 1999) y de blastocistos (Hasler et al., 1998); de hecho, fueron estadísticamente similares a las observadas por el grupo de progesterona alta.

Asimismo, de acuerdo con Fair y Lonergan (2012) y Lonergan y Sánchez (2020), la maduración ovocitaria es la fase más crítica de la producción *in vitro* de embriones, pues les permite a dichas estructuras alcanzar el potencial de desarrollo para la inducción de numerosos cambios morfológicos y bioquímicos. Algunos trabajos reportaron que la progesterona probablemente está relacionada con un efecto antiapoptótico sobre las células del cúmulo, lo cual favorece que los ovocitos adquieran la competencia para el desarrollo *in vitro* (Friberg et al., 2009; Salhab et al., 2011). Los resultados en las hembras Gyr indicaron que una alta circulación de progesterona en la sangre no tuvo efecto sobre la producción de embriones. No obstante, las vacas que fueron sometidas a concentraciones bajas de progesterona mostraron mejores tasas de blastocistos, mecanismo asociado con el incremento en la frecuencia de los pulsos de la LH, hormona que posiblemente está relacionada con un efecto antiatrésico, de manera que favorece la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario.

Conclusiones

Los resultados del estudio permiten concluir que la progesterona tiene un efecto en el desarrollo embrionario en vacas de raza Gyr, efecto que no se evidencia en vacas de raza Holstein. Por este motivo es necesario realizar nuevos estudios que puedan determinar el efecto de la progesterona sobre la producción de embriones *in vitro* en vacas Holstein.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Embrapa Gado de Leite, Campo Experimental Santa Mónica - CESM por facilitar los animales. A Pesagro-Rio, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro y la Universidad de Santander por la financiación del estudio.

Descargos de responsabilidad

Todos los autores realizaron aportes significativos al documento, están de acuerdo con su publicación y manifiestan que no existen conflictos de interés en este estudio.

Referencias

- Abreu, F. M., Coutinho da Silva, M. A., Cruppe, L. H., Mussard, M. L., Bridges, G. A., Harstine, B. R., Smith, G. D., Geary, T. W., & Day, M. L. (2018). Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: I. Characteristics of LH secretion and oocyte quality. *Animal Reproduction Science*, *196*, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.020>
- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, *69*(1), 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>
- Al-Katanani, Y., Paula-Lopes, F., & Hansen, P. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *85*(2), 390-396. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74086-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74086-1)
- Boediono, A., Rajamahendran, R., Saha, S., Sumantri, C., & Suzuki, T. (1995). Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle. *Theriogenology*, *43*(1), 169. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)92323-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)92323-2)
- Cerri, R. L. A., Chebel, R. C., Rivera, F., Narciso, C. D., Oliveira, R. A., Amstalden, M., Baez-Sandoval, G. M., Oliveira, L. J., Tatcher, W. W., & Santos, J. E. P. (2011). Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *Journal of Dairy Science*, *94*, 3352-3365. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3735>
- Chaubal, S. A., Ferre, L. B., Molina, J. A., Faber, D. C., Bols, P. E. J., Rezamand, P., Tian, X., & Yang, X. (2007). Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*, *67*(4), 719-728. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.022>
- Chauhan, M. S., Nadir, S., Bailey, T. L., Pryor, A. W., Butler, S. P., Notter, D. R., & Gwazdauskas, F. C. (1999). Bovine follicular dynamics, oocyte recovery, and development of oocytes microinjected with a green fluorescent protein construct. *Journal of Dairy Science*, *82*, 918-926. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(99\)75310-5/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(99)75310-5/pdf)
- Chian, R. C., Chung, J. T., Downey, B. R., & Tan, S. L. (2002). Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis.

Reproductive Biomedicine Online, 4(2), 127-132. [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)61929-3/pdf](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)61929-3/pdf)

De Wit, A. A. C., Wurth, Y. A., & Kruip, T. A. M. (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science*, 78(5), 1277-1283. <https://doi.org/10.2527/2000.7851277x>

El-Sherry, T. M., Matsui, M., Kida, K., Miyamoto, A., Megahed, G. A., Shehata, S. H., & Miyake, Y.-I. (2010). Ovarian stimulation with follicle-stimulating hormone under increasing or minimal concentration of progesterone in dairy cows. *Theriogenology*, 73(4), 488-495. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.031>

Evans, A. C. O., Mossa, F., Walsh, S. W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., & Ireland, J. J. (2012). Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s4), 31-37. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x>

Fair, T., & Lonergan, P. (2012). The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s4), 142-147. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02068.x>

Ferreira, R. M., Ayres, H., Maio, J. R. G., & Baruselli, P. S. (2009). Day of follicular wave emergence of Holstein heifers and cows submitted to protocols for synchronization of follicular wave emergence using or not injectable progesterone. *Animal Reproduction*, 6, 259. https://www.researchgate.net/publication/284773193_Day_of_follicular_wave_emergence_of_Holstein_heifers_and_cows_submitted_to_protocols_for_synchronization_of_follicular_wave_emergence_using_or_not_injectable_progesterone/link/573b93d308aea45ee840668e/download

Fonseca, F. A., Britt, J. H., McDaniel, B. T., Wilk, J. C., & Rakes, A. H. (1983). Reproductive traits of Holsteins and Jerseys, effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *Journal of Dairy Science*, 66, 1128-1147. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(83\)81910-9/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(83)81910-9/pdf)

Friberg, P. A., Larsson, D. G. J., & Billig, H. (2009). Dominant role of nuclear progesterone receptor in the control of rat periovulatory granulosa cell apoptosis. *Biology of Reproduction*, 80(6), 1160-1167. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073932>

Garcés Giraldo, L. F., & Giraldo Zuluaga, C. (2012). Bioética en la experimentación científica con animales: Cuestión de reglamentación o de actitud humana. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1), 159-166. <https://www.redalyc.org/pdf/695/69524955012.pdf>

Gimenes, L. U. (2010). Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos, e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular. (Tesis de Doctorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil). Repositorio USP. https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-20012011-115005/publico/Lindsay_Unno_Gimenes.pdf

Hasler, J. F. (1998). The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science*, 76(3), 52-74. https://doi.org/10.2527/1998.76suppl_352x

Hendriksen, P. J. M., Steenweg, W. N. M., Harkema, J. C., Merton, J. S., Bevers, M. M., Vos, P. L. A. M., & Dieleman, S. J. (2004). Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 61(5), 909-920. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00278-4)

Kesler, D. J., Dyson, T. S., Summers, R. N., Steckler, T. L., & Nash, T. G. (1997). Effect prostaglandin F2 α treatment before norgestomet and estradiol valerate treatment on regression, formation, and function of corpora lutea in beef heifers. *Animal Reproduction Science*, 47(4), 281-289. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00023-7)

Kesler, D. J., Favero, R. J., & Troxel, T. R. (1995). A comparison of hydron and silicone implants in the bovine norgestomet and estradiol valerate estrus synchronization procedure. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21(4), 475-485. <https://doi.org/10.3109/03639049509026636>

- Loneragan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76(9), 1594-1601. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.012>
- Loneragan, P., Forde, N., & Spencer, T. (2016). Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 66-74. <http://dx.doi.org/10.1071/RD15326>
- Loneragan, P., Woods, A., Fair, T., Carter, F., Rizos, D., Ward, F., Quinn, K., & Evans, A. (2007). Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 19, 861-868. <https://doi.org/10.1071/RD07089>
- Loneragan, P., & Sánchez, J. M. (2020). Symposium review: Progesterone effects on early embryo development in cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 8698-8707. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18583>
- Machado, R., & Kesler, D. J. (1996). Efficacy of norethindrone acetate and norgestomet implants in suppressing estrus in female beef cattle. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 22(12), 1211-1216. <https://doi.org/10.3109/03639049609063239>
- Machatková, M., Krausová, K., Jokesová, E., & Tomanek, M. (2004). Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 61(2-3), 329-335. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00216-4)
- Maluf, D. Z., Pires, A. V., Susin, I., Moreira, R. J. C., Madureira, E. H., Binelli, M., Gonçalves, J. R., Lima, L. G., Mendes, C. Q., & Biehl, M. V. (2010). Avaliação da reutilização de implantes contendo progestágenos na taxa de prenhez em vacas de corte. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 47(1), 38-46. <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26847/28630>
- McGuire, W. J., Larson, R. L., & Kiracofe, G. H. (1990). Syncro-mate B® induces estrus in ovariectomized cows and heifers. *Theriogenology*, 34(1), 33-37. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90574-D](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90574-D)
- Moore, S., & Hasler, J. (2017). A 100-year review: reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314-10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- Oliveira, C. S., Serapião, R. V., Camargo, A. J. R., Freitas, C., Iguma, L. T., Campos Carvalho, B. C., Almeida Camargo, L. S., Zoccolaro Oliveira, L., & Verneque, R. S. (2019). Oocyte origin affects the *in vitro* embryo production and development of Holstein (*Bos taurus taurus*) - Gyr (*Bos taurus indicus*) reciprocal cross embryos. *Animal Reproduction Science*, 209, Article number 106165. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106165>
- Parrish, J., Krogenaes, A., & Susko-Parrish, J. L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44(6), 859-869. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9)
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., & Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 31(1), 63-67. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310111>
- Perry, G. A., Welshons, W. V., Bott, R. C., & Smith, M. F. (2005). Basis of melengestrol acetate action as a progestin. *Domestic Animal Endocrinology*, 28(2), 147-161. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.07.002>
- Pfeifer, L. F. M., Sartori, R., Pivato, I., Rumpf, R., Nogueira, G. P., Xavier, E. G., Dionello, N. J. L., & Corrêa, M. N. (2009). Effect of circulating progesterone on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction*, 6(3), 473-480. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6071f7783717068b477a/pdf/animreprod-6-3-473.pdf>
- Pirestani, A., Hosseini, S. M., Hajian, M., Forouzanfar, M., Moulavi, F., Abedi, P., Gourabi, H., Shahverdi, A., Taqi Dizaj, A. V., & Esfahani, M. H. N. (2011). Effect of ovarian cyclic status on *in vitro* embryo production in cattle. *International Journal of Fertility and Sterility*, 4(4), 172-175. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4023504/pdf/Int-J-Fertil-Steril-4-172.pdf>
- Saad, M., Sarwar, Z., Saleem, M., Arshad, U., Shahzad, M., Mushtaq, M. H., Husnain, A., Riaz, A., & Ahmad, N. (2019). Effect of plasma progesterone on oocyte recovery, oocyte quality, and early *in vitro* developmental competence of embryos in *Bos indicus* dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 202, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.001>

Salhab, M., Tosca, L., Cabau, C., Papillier, P., Perreau, C., Dupont, J., Mermillod, P., Uzbekova, S. (2011). Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. *Theriogenology*, 75(1), 90-104. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.014>

Santiago, L. L., Alves Torres, C., Uribe-Velázquez, L. F., Cecon, P. R., & Terra Nogueira, E. (2001). Perfil hormonal de progesterona durante o ciclo estral em novilhas Nelore confinadas com diferentes ondas de crescimento folicular. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(6s), 2017-2020. <https://www.scielo.br/pdf/rbz/v30n6s0/7413.pdf>

Sato, E., Matsuo, M., & Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: Improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Journal of Animal Science*, 68(4), 1182-1187. <https://doi.org/10.2527/1990.6841182x>

Snijders, S. E. M., Dillon, P., O'Callaghan, D., & Boland, M. P. (2000). Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte development in dairy cows. *Theriogenology*, 53(4), 981-989. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00244-2)

Stringfellow, D. A., & Givens, M. D. (2010). Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Illinois: International Embryo Transfer Society Inc.

Takuma, T., Otsubo, T., Kurokawa, Y., & Otoi, T. (2007). 416 effects of the corpus luteum within the ovary on the follicular dynamics after follicular aspiration and on the developmental competence of aspirated oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1), 324. <https://doi.org/10.1071/RDv19n1Ab416>

Torres-Júnior, J. R. de S., Pires, M. de F. A., De Sá, W. F., Ferreira, A. de M., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. A., Ramos, A. A., Folhadella, I. M., Polisseni, J., De Freitas, C., Clemente, C. A. A., De Sá Filho, M. F., Paula-Lopes, F. F., & Baruselli, P. S. (2008). Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 69(2), 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.023>

Uribe-Velásquez, L., Correa-Orozco, A., Cuartas-Betancurth, L., Villamizar-Ramírez, D., & Ángel-Botero, S. (2013). Evaluación de implantes de norgestomet reutilizados en protocolos de sincronización del estro en vacas Brahman. *Revista MVZ Córdoba*, 18(1), 3336-3345. <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/196/265>