



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EFFECTO DE LA HORMONA FOLICULOESTIMULANTE (FSH) EN DOSIS ÚNICA
POR VÍA EPIDURAL, PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO***

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista

Autores:

Diego Esteban Araujo Carrera

CI: 0105088157

Correo electrónico: dieg.esteb@gmail.com

Paola Clementina Cordero Zhindón

CI: 0301691655

Correo electrónico: pao.cordero46@gmail.com

Director:

Luis Eduardo Ayala Guanga, PhD

CI: 0102635463

Cuenca, Ecuador

16-noviembre-2021



Resumen

La investigación se llevó a cabo en diferentes granjas de las provincias de Azuay y Cañar; el objetivo fue determinar la efectividad de la administración de hormona foliculoestimulante (FSH) en dosis única aplicada por vía epidural, para la producción de embriones *in vivo*. Se compararon dos protocolos de superovulación (SOV); convencional (G1), vía epidural y uní dosis de FSH (G2). Se valoró la respuesta al proceso de superovulación, porcentaje de ovulación, cantidad y calidad de estructuras colectadas de cada protocolo. La valoración de la respuesta superovulatoria tuvo igual número de folículos en cada tratamiento (G1=17,6±1,93 vs. G2=13,9±2,29; $P<0,05$). De igual forma no se evidenció diferencia estadística entre grupos en el tamaño de los folículos que respondieron a la SOV, G1=10,5±0,49 mm vs. G2=9,9±0,44 mm; $P>0,05$. Sin embargo, existió un aumento significativo en la respuesta a la superovulación cuando se contó el número de cuerpos lúteos (CL); G1=14,4±1,7 vs. G2=7,8±1,9; ($P<0,05$); esta misma tendencia se obtuvo al valorar el tamaño de cada CL de cada grupo lo que determinó un promedio de 14,8±1,1 mm para G1 y 11,1±1,7 mm para G2 ($P<0,05$). Se evidenció un aumento significativo ($P<0,05$) en el número de estructuras obtenidas para G1=8,7±1,4 a comparación de G2=3,4±0,9 ($P<0,05$); sin embargo, el porcentaje de embriones en los diferentes estadios de desarrollo no difirió entre grupos ($P>0,05$). En conclusión, la hormona folículo estimulante (FSH), administrada por vía epidural en dosis única provoca que el proceso superovulatorio medido en respuesta al número y tamaño de folículos es similar a la respuesta que se obtiene cuando se aplica un protocolo de superovulación convencional.

Palabras clave: Embrión. Superovulación. Epidural. Dosis única. FSH.



Abstract

The research was carried out in different farms in the provinces of Azuay and Cañar; the objective was to determine the effectiveness of the administration of follicle-stimulating hormone (FSH) in a single dose applied by the epidural route, for *in vivo* embryo production. Two superovulation protocols (SOV) were compared; conventional (G1), epidural route and single dose of FSH (G2). The response to the superovulation process, ovulation percentage, quantity and quality of the structures collected from each protocol were evaluated. The evaluation of the superovulatory response had the same number of follicles in each treatment (G1=17.6±1.93 vs. G2=13.9±2.29; P<0.05). Similarly, no statistical difference was evidenced between groups in the size of the follicles that responded to the SOV, G1=10.5±0.49 mm vs. G2=9.9±0.44 mm; (P>0.05). However, there was a significant increase in the response to superovulation when the number of corpora lutea (LC) was counted; G1=14.4±1.7 vs. G2=7.8±1.9; P<0.05); this same trend was obtained when evaluating the size of each LC in each group which determined an average of 14.8±1.1 mm for G1 and 11.1±1.7 mm for G2 (P<0.05). There was a significant increase (P <0.05) in the number of structures obtained for G1=8.7±1.4 compared to G2=3.4±0.9 (P<0.05); however, the percentage of embryos in the different stages of development did not differ between groups (P> 0.05). In conclusion, the follicle-stimulating hormone (FSH), administered for epidural route in a single dose, makes the superovulatory process measured in response to the number and size of follicles similar to the response obtained when a conventional superovulation protocol is applied.

Keywords: Embryo. Superovulation. Epidural. Single Dose. FSH.



Índice del Trabajo

Resumen	2
Abstract	3
Índice del Trabajo	4
Índice de Tablas	7
Índice de Figuras	8
Índice de Anexos	10
Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional	11
Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional	12
Cláusula de Propiedad Intelectual	13
Cláusula de Propiedad Intelectual	14
Agradecimientos	15
Dedicatoria	16
1 INTRODUCCIÓN	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Fisiología del ciclo estral bovino	22
3.1.1 Dinámica folicular	24
3.1.2 Gonadotropinas en el desarrollo de la onda folicular	25
3.2 Multiovulación y transferencia de embriones (MOET)	26
3.3 Superovulación (SOV)	27
3.3.1 Variabilidad de la respuesta superovulatoria	28
3.4 Factores que afectan la respuesta superovulatoria	28
3.4.1 Factores intrínsecos	29
3.4.2 Factores extrínsecos	31
3.5 Protocolos para superovulación	33



3.6	Sincronización de la onda folicular	35
3.6.1	Sincronización con estrógenos	35
3.6.2	Sincronización usando ablación folicular	35
3.6.3	Sincronización con GnRH.....	36
3.7	Protocolos de sincronización en bovinos usados en la región	36
3.8	Protocolos alternativos de superovulación	37
3.9	Tiempo de ovulación	40
3.10	Farmacocinética y farmacodinamia de la FSH por vía epidural	41
3.11	Transferencia de embriones.....	43
3.12	Colección de embriones.....	44
3.12.1	Recuperación no quirúrgica de embriones	45
3.13	Evaluación y selección de los embriones.....	45
3.13.1	Etapas de desarrollo embrionario.....	46
3.13.2	Calidad embrionaria.....	50
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
4.1	Materiales.....	53
4.1.1	Materiales biológicos	53
4.1.2	Materiales químicos.....	53
4.1.3	Materiales físicos	53
4.2	Métodos	54
4.2.1	Área de estudio.....	54
4.2.2	Protocolo de superovulación convencional.....	54
4.2.3	Protocolo de superovulación vía epidural	55
4.2.4	Valoración de la respuesta superovulatoria	56
4.2.5	Valoración de la ovulación dentro del protocolo de SOV	56
4.2.6	Recolección de embriones	57
4.2.7	Valoración de los embriones obtenidos	57
4.3	Diseño experimental.....	59
	Tratamientos.....	59
4.3.1	Análisis estadístico	60



5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.1	Comparación de CC, peso, edad, número de partos y producción láctea de los animales de los dos tratamientos	61
5.2	Resultados generales del recuento de folículos antrales (RFA) el día 0 (inicio del protocolo)	61
5.3	Resultados generales del número de folículos antrales (RFA) que respondieron al protocolo de superovulación en el día 9.	62
5.4	Resultados generales del número de cuerpos lúteos (CL) observados el día de la colecta de embriones en el día 16.	63
5.5	Resultados generales del número de estructuras, embriones y UFO´s colectados el día 16 del protocolo	64
5.6	Recuento de folículos antrales (RFA), valorado el día 0 del protocolo en el grupo convencional y epidural	64
5.7	Recuento de folículos antrales (RFA), que respondieron al protocolo de superovulación, convencional (G1) y epidural (G2) valorado el día 9	66
5.8	Recuento de cuerpos lúteos (CL), el día 16 del protocolo en el grupo convencional (G1) y epidural (G2)	68
5.9	Recuento de folículos que no ovularon (folículos anovulatorios), el día 16 del protocolo en el grupo convencional (G1) y epidural (G2)	71
5.10	Número de estructuras, embriones transferibles y ovocitos no fecundados obtenidos en el grupo convencional (G1) y epidural (G2)	72
5.11	Calidad de los embriones obtenidos en el grupo convencional (G1) y epidural (G2)	74
6	CONCLUSIONES	76
7	BIBLIOGRAFÍA	77
8	ANEXOS	89



Índice de Tablas

Tabla 1: Valores medios y error estándar de la CC, peso, edad, partos y promedio de leche de las vacas del grupo convencional y epidural.....	61
Tabla 2: Resumen de la media y error estándar de las variables evaluadas durante el protocolo de SOV en el total de animales en estudio (n=20).....	63
Tabla 3: Número promedio de embriones transferibles obtenidos de acuerdo a la calidad de cada uno de estos presentes en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.	75



Índice de Figuras

Figura 1: Esquema de la interacción hormonal en el eje Hipófisis-hipotálamo	24
Figura 2: Ovocito sin fecundar.....	46
Figura 3: Mórula temprana	47
Figura 4: Mórula	47
Figura 5: Mórula compacta.....	48
Figura 6: Blastocisto temprano.....	48
Figura 7: Blastocisto.....	49
Figura 8: Blastocisto expandido	49
Figura 9: Blastocisto eclosionado.....	50
Figura 10: Blastocisto de calidad excelente	51
Figura 11: Mórula de calidad regular.....	51
Figura 12: Mórula de calidad mala	52
Figura 13: Embrión congelado	52
Figura 14: Ubicación del área de estudio (Azuay-Cañar).....	54
Figura 15: Protocolo de superovulación (SOV) convencional y colección de embriones.....	55
Figura 16: Protocolo de superovulación (SOV) vía epidural y colección de embriones.....	56
Figura 17: Valor medio del recuento de los folículos antrales (RFA) antes del inicio del protocolo de SOV. Prueba de Tukey al 5%. ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.....	66
Figura 18: Número medio de folículos que respondieron al protocolo de superovulación (SOV), en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.....	67
Figura 19: Tamaño medio de los folículos que respondieron al protocolo de superovulación (SOV), en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.....	68



- Figura 20:** Número medio de cuerpos lúteos observados previo al lavado de embriones, en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos. 69
- Figura 21:** Tamaño medio de los cuerpos lúteos observados previo al lavado de embriones en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos. 70
- Figura 22:** Número promedio de folículos que no llegaron a ovular (folículos anovulatorios), observados previo al lavado de embriones en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos..... 72
- Figura 23:** Número promedio de estructuras, embriones transferibles y ovocitos sin fecundar recuperadas luego del lavado en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos. 74



Índice de Anexos

Anexo 1: Selección de donadoras.....	89
Anexo 2: Observación y detección de celo	90
Anexo 3: Valoración de la respuesta superovulatoria	91
Anexo 4: Valoración de la ovulación	91
Anexo 5: Recolección de embriones	92
Anexo 6: Valoración de los embriones obtenidos.....	93



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Diego Esteban Araujo Carrera en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "EFECTO DE LA HORMONA FOLICULOESTIMULANTE (FSH) EN DOSIS ÚNICA POR VÍA EPIDURAL, PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 16 de noviembre de 2021

Diego Esteban Araujo Carrera

C.I: 0105088157



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Paola Clementina Cordero Zhindón en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "EFECTO DE LA HORMONA FOLICULOESTIMULANTE (FSH) EN DOSIS ÚNICA POR VÍA EPIDURAL, PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 16 de noviembre de 2021

Paola Clementina Cordero Zhindón

C.I: 0301691655



Cláusula de Propiedad Intelectual

Diego Esteban Araujo Carrera, autor del trabajo de titulación "EFECTO DE LA HORMONA FOLICULOESTIMULANTE (FSH) EN DOSIS ÚNICA POR VÍA EPIDURAL, PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 16 de noviembre de 2021

Diego Esteban Araujo Carrera

C.I: 0105088157



Cláusula de Propiedad Intelectual

Paola Clementina Cordero Zhindón, autora del trabajo de titulación "EFECTO DE LA HORMONA FOLICULOESTIMULANTE (FSH) EN DOSIS ÚNICA POR VÍA EPIDURAL, PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 16 de noviembre de 2021

Paola Clementina Cordero Zhindón

C.I: 0301691655



Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a nuestro tutor de tesis Dr. Luis Ayala por su paciencia y conocimientos que nos guió para poder seguir adelante en este proyecto de titulación.

También quiero agradecer a mi madre que con su infinito apoyo me pudo dar palabras de aliento para no dejarme vencer, y de igual forma a mi hermana que ha sido un pilar fundamental en mi vida para lograr este objetivo.

Por último, quiero agradecer a Paola mi compañera de tesis y a todos los profesores y amigos que acompañaron directa o indirectamente en todo este trabajo, dándome ánimos y consejos.

¡Muchas gracias a todos!

Diego Araujo

Agradezco a mi madre por ser el motivo y la razón de todos mis logros, por su trabajo y sacrificio diario para formarme como persona de bien; a mi prima Noelia que me ha brindado su ayuda incondicionalmente y me ha impulsado para lograr mis objetivos.

Un agradecimiento especial al Dr Luis Ayala quien nos ha guiado durante todo el desarrollo del presente trabajo brindándonos su paciencia y conocimientos; por su rectitud como docente y como persona.

A Diego mi amigo y compañero de Universidad, por su paciencia y lealtad, a los Doctores José Luis Pesántez, Xavier Samaniego, Andrés Jácome y a todos mis profesores y amigos que de una u otra forma me brindaron su apoyo y se involucraron en este trabajo impartiendo sus conocimientos y experiencias de manera desinteresada.

Paola Cordero



Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mi madre Myriam que siempre me apoyó en todas mis decisiones y me supo dar las mejores palabras de aliento para no dejarme vencer. A Bernarda mi hermana por ser mi ejemplo en cada paso que pude dar en mi vida académica.

A mis amigos en especial a Cristina que me apoyó durante todos estos años de estudio.

Diego Araujo

A mi madre Aida que ha sido el pilar fundamental de mi vida, quien con todo su amor, paciencia, esfuerzo y lealtad me ha forjado como persona, misma que ha sabido valorar el esfuerzo dedicado al desarrollo de mi formación profesional brindándome su apoyo incondicional.

A mi prima Noelia y mi tía Norma que siempre me ha brindado su apoyo y ánimo en los momentos más difíciles, quienes me motivan día a día a seguir adelante.

A la memoria de mi padre Alejandro, mis abuelitos: Manuel, Luis y Clementina, mi tío Pablo y mi mejor amiga Cristina.

Paola Cordero



Abreviaturas y simbología

AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico

BE: Benzoato de estradiol

CC: Condición corporal

CL: Cuerpo lúteo

DIV: Dispositivo intravaginal

E2: Estradiol

eCG: Gonadotropina coriónica equina

ET: Transferencia de embriones

FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico-2

FSH: Hormona foliculoestimulante

FTAI: Inseminación artificial a tiempo fijo

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

hMG: Gonadotropina menopáusica humana

IA: Inseminación artificial

IETS: Sociedad internacional de transferencia de embriones

IGF-I: Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I

IM: Intramuscular

kg: Kilogramo

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LH: Hormona luteinizante



LRH: Hormona luteinizante recombinante

mg: Miligramos

MHz: Megahercio

ml: Mililitro

mm: Milímetro

MOET: Multiovulación y transferencia de embriones

msnm: metros sobre el nivel del mar

NaCl: Cloruro de sodio

NIH-FSH-P1: National Institute of Health-porcine1-FSH

OPU: Ovum Pick-Up

P4: Progesterona

PBS: Phosphate buffered saline

pFSH: Hormona foliculoestimulante porcina

PG: Prostaglandina

PGF2 α : Prostaglandina F2 alfa

pLH: Hormona luteinizante porcina

PVP: Polivinilpirrolidona

RFA: Recuento de folículos antrales

SC: Subcutánea

SOV: Superovulación

UA: Unidad armour

UFO: Ovocito sin fecundar



1 INTRODUCCIÓN

La multiovulación y transferencia de embriones (MOET), es una técnica reproductiva que se viene usando desde la década de los años 70 (Hasler, 2014), y ha permitido aumentar la cantidad de animales genéticamente superiores en las últimas décadas; sin embargo, en los últimos 35 años los resultados obtenidos no han mejorado debido a la alta variabilidad en la respuesta al proceso de superovulación (Bó & Mapletoft, 2014). Esta variabilidad está ligada a factores intrínsecos, como la raza (Becaluba, 2007; Mikkola et al., 2020), edad (Jiménez, 2009), estado reproductivo (Castro & Rodríguez, 2014), dinámica folicular (Jiménez, 2009), o aspectos extrínsecos como la nutrición (Mikkola et al., 2020), manejo, estación del año, tipo de la hormona empleada (Mapletoft et al., 2002), dosis (Becaluba, 2007), frecuencia y vía de administración (Castro & Rodríguez, 2014).

Si bien, a nivel mundial se ha estandarizando el uso de la hormona folículo estimulante (FSH) por vía intramuscular para inducir el crecimiento folicular y mejorar la eficiencia en la producción de embriones *in vivo* (Hasler, 2014), esta gonadotropina debe ser aplicada cada 12 horas durante un intervalo de tiempo de entre 4 a 5 días consecutivos (Mapletoft et al., 2002), debido a que la vida media de esta hormona es de entre 2 a 5 horas (Hasler, 2014; Bó & Mapletoft, 2020). Es así que, la necesidad de inyectar dos veces al día FSH, requiere una atención meticulosa del personal de la granja y si no se sigue detalladamente esta afirmación aumenta la posibilidad de generar fallas por un manejo inadecuado y errores en la aplicación de la hormona (Looney et al., 1981). Además, está descrito que la manipulación excesiva de los animales por manejo ocasiona estrés de la donadora y consecuentemente reduce la respuesta al proceso de superovulación (Macedo et al., 2011)

Por lo tanto, como una alternativa a disminuir el estrés ocasionado por el manejo de los animales es reducir el número de aplicaciones de FSH, sin ocasionar variabilidad en la respuesta a la superovulación, a partir de esta afirmación se han probado la utilización de una dosis alta de FSH diluida en solución salina



(Yamamoto et al., 1994), por vía subcutánea (Alvarez et al., 2010) e intramuscular (Sugano & Shinogi, 1999); sin embargo, los resultados obtenidos en estos trabajos son contradictorios, según los autores debido a la cantidad de grasa que presentan las donadoras al inicio del protocolo (Alvarez et al., 2010).

Es así que, otra vía de administración que han generado gran expectativa es la epidural, ya que, la absorción de los fármacos (analgésicos, anestésicos) por esta vía se realizan en forma más lenta hacia el sistema circulatorio, esto gracias a la cantidad de grasa depositada en el canal vertebral y las venas que posee la duramadre (Apaza, 2017). Además, está documentado que la eliminación de un fármaco está ligado al grado de solubilidad del mismo (Mugabure et al., 2005). En este contexto hemos evidenciado un solo trabajo realizado en vacas negras japonesas (Wagyu), en las que se les administró FSH por vía epidural a una dosis alta (200 mg) disuelta en solución salina, llegando a obtener resultados similares a los de un protocolo convencional (Sakaguchi et al., 2018). Sin embargo, estos autores concluyen que se debe seguir investigando esta vía de aplicación, dosis y el comportamiento de las mismas en las diferentes razas bovinas.



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la efectividad de la administración de hormona foliculoestimulante (FSH) en dosis única por vía epidural, para la producción de embriones *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta al proceso de superovulación mediante el conteo de folículos >8 mm en el día nueve del protocolo previo a la inseminación artificial.
- Establecer el porcentaje de ovulación a través del conteo de cuerpos lúteos en el día de la colecta de embriones.
- Comparar la cantidad y calidad de estructuras colectadas en el protocolo convencional y alternativo de superovulación.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fisiología del ciclo estral bovino

El ciclo estral en bovinos se puede definir como el ciclo biológico reproductivo de las hembras, comprendido desde la aparición de un estro con ovulación hasta el comienzo del siguiente (Atuesta & Gonella, 2011), que abarca una serie de procesos que ocurren al inicio de la pubertad y que suceden cíclicamente tanto en el ovario, tracto reproductivo y en la conducta de la vaca como tal (Matamoros & Salinas, 2017), cuyo acontecimiento central es la manifestación del estro o calor y la liberación de un ovocito maduro del folículo preovulatorio a través del proceso denominado ovulación (Maldonado et al., 1997; Rippe, 2009).

La hembra bovina es un animal poliéstrico con ciclos estrales en intervalos de 19 a 23 días, con 21 días en promedio (Hernández, 2016). Endocrinológicamente este proceso está regulado por hormonas hipotalámicas (GnRH), hipofisarias (LH, FSH), ováricas (P4, E2 e inhibinas, oxitocina), uterinas (PGF2 α) que actúan en conjunto con un sistema de retroalimentación negativa y positiva para llevar a cabo con éxito el ciclo estral (Matamoros & Salinas, 2017), controlando directamente la esencia de la maduración folicular, ovulación, implantación y mantenimiento de la gestación (Motta et al., 2011). La GnRH llega a través del sistema porta-hipotalámico-hipofisario y controla la liberación de la FSH y LH (Colazo & Mapletoft, 2014; Echeverría, 2006).

El ciclo estral bovino se puede dividir en dos o tres fases o estadios. Según Carvajal & Martínez, (2020); y Matamoros & Salinas, (2017), el ciclo estral comprende la fase lútea (metaestro y diestro) y fase folicular (proestro, estro), mientras que Becaluba, (2007); y Rippe, (2009) mencionan que el ciclo estral se puede dividir en tres fases: 1) Fase folicular o de regresión lútea (proestro), 2) Fase periovulatoria (estro y metaestro) y 3) Fase luteal (diestro).

- **Fase folicular:** Las concentraciones de P4 son bajas ya que hay regresión del cuerpo lúteo, aumenta las concentraciones de E2 por parte de folículo



preovulatorio dominante que induce un pico de GnRH lo que en conjunto refleja el comportamiento del celo, el cual está caracterizado por la receptividad de las hembras al macho y el comportamiento sexual exacerbado, que permitirá la cópula (Bearden & Fuquay, 1982). El pico de GnRH, induce la liberación de LH y FSH, y posteriormente de 27 a 30 horas después ocurre la ovulación (Campo et al., 1985; Colazo & Mapletoft, 2014).

- **Fase luteal:** Los primeros días se conocen como metaestro el cual tiene una duración de aproximadamente 3 a 4 días; en esta etapa del ciclo estral inicia la formación del cuerpo lúteo, que en ese momento se denomina cuerpo hemorrágico (Colazo & Mapletoft, 2014). En el quinto día del ciclo estral (diestro) hay una mayor concentración sérica de P4 >1 ng/ml debido a la formación del cuerpo lúteo como tal, que es el encargado de secretar dicha hormona, cuya función es preparar al útero para el mantenimiento e implantación de una posible gestación si el óvulo resulta fecundado (Carvajal & Martínez, 2020; Colazo & Mapletoft, 2014; Hernández, 2016). Durante el diestro existe el crecimiento de una nueva onda folicular, con un folículo dominante no ovulatorio, mismo que se atresiará y permitirá el desarrollo de una nueva onda folicular, debido a que la cantidad de P4 está aumentada y hay una retroalimentación negativa sobre la GnRH que permite pulsos de LH de mayor amplitud pero de menor frecuencia (1 pulso cada 3-4 horas) (Brito, 2009; Guáqueta, 2009). Pasado un periodo de 12-14 días de exposición a P4, y si la vaca no está gestante, se produce la luteólisis (destrucción del cuerpo lúteo) desapareciendo el estímulo inhibitorio de las gonadotropinas; en respuesta a la secreción de PGF2 α del útero lo cual da inicio nuevamente al proestro que se caracteriza por incrementar la frecuencia de los pulsos de LH que llevan a la maduración del folículo ovulatorio (Brito, 2009; Campo et al., 1985).

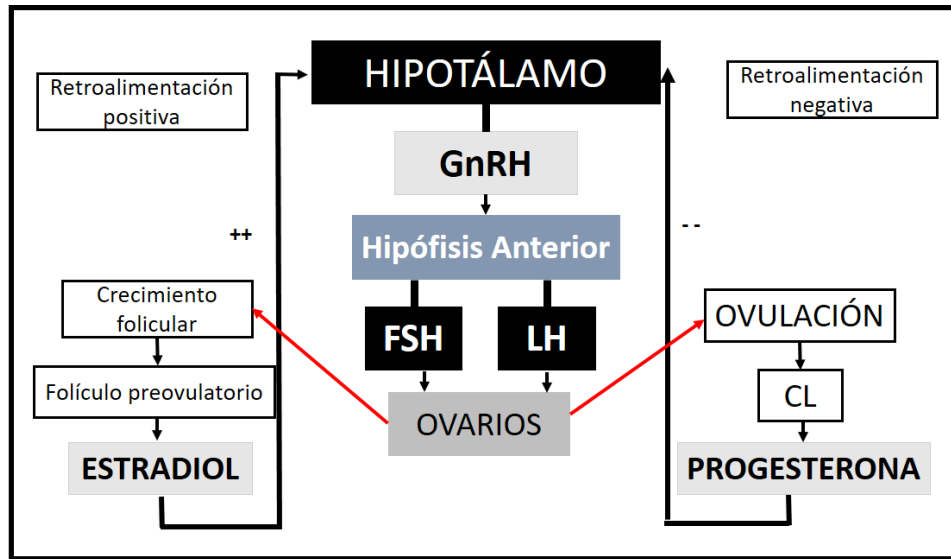


Figura 1: Esquema de la interacción hormonal en el eje Hipófisis-hipotálamo

Fuente: (Rippe, 2009)

3.1.1 Dinámica folicular

Se define como dinámica folicular al proceso de crecimiento continuo y la regresión de los folículos antrales, que conllevan a la obtención de un folículo preovulatorio (Becaluba, 2007; Maldonado et al., 1997). Este proceso se desarrolla en forma de ondas; y en cada ciclo estral pueden ocurrir entre dos a tres oleadas (Espinoza et al., 2007; Filipiak et al., 2016; Rippe, 2009). Durante el crecimiento de una onda folicular se pueden describir cuatro fases (Del Valle, 2008):

- **Reclutamiento:** Proceso mediante el cual una cohorte de folículos antrales de aproximadamente 2 a 5 mm, da inicio al proceso de crecimiento y maduración bajo su capacidad de respuesta ante un aumento en la concentración de FSH, que permite avanzar con su desarrollo (Del Valle, 2008; Maldonado et al., 1997; Tovío & Duica, 2012).
- **Selección:** Es el proceso por el cual uno o varios folículos son elegidos para ser dominantes, alcanza un diámetro marcadamente superior a los demás folículos, evitan la atresia y adquiere el potencial para llegar a ovular, mientras los demás folículos de esa cohorte se vuelven atrésicos, por la interferencia del folículo más grande sobre la capacidad de crecimiento de



los folículos más pequeños de recibir un adecuado soporte gonadotrópico. El folículo seleccionado es aquel que adquiere, primero que el resto, un número mayor de receptores para LH (Colazo & Mapletoft, 2014; Del Valle, 2008; Filipiak et al., 2016).

- **Dominancia:** Proceso por el cual el folículo dominante seleccionado inhibe el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos, alcanza un tamaño mayor a los demás y es responsable de secretar estradiol y continuar creciendo incluso en presencia de otras hormonas que crean un medio adverso para el resto de folículos subordinados lo que impiden su crecimiento (proceso de desviación) (Espinoza et al., 2007; Fernández, 2003; Rippe, 2009; Tovío & Duica, 2012).

3.1.2 Gonadotropinas en el desarrollo de la onda folicular

Fisiológicamente la hembra bovina tiene la capacidad de tener en cada ciclo estral un folículo en crecimiento el cual llegará a ovular, mientras que al mismo tiempo no permite el reclutamiento folicular entre ondas foliculares, minimizando el desgaste de folículos de la reserva. Este proceso se encuentra basado en la capacidad de respuesta diferencial a las gonadotropinas FSH y LH (Colazo & Mapletoft, 2014). El aumento de los niveles de FSH en la sangre permite la emergencia de las ondas foliculares, los folículos reclutados responden al incremento transitorio de FSH aumentando su crecimiento y la síntesis de estradiol, así como una elevación en la producción de inhibinas de alto peso molecular y activina; posteriormente el aumento de los niveles de FSH es suprimido por el feedback negativo de los estrógenos e inhibina previniendo el surgimiento de una nueva onda folicular. El aumento transitorio de FSH permite que algunos folículos maduren y adquieran capacidad de respuesta a la LH, esto permite que 2,8 días después de la emergencia de la nueva onda folicular, es decir cuando tiene un tamaño de 8,5 mm la FSH disminuye notablemente y el folículo a convertirse en dominante va a tener más receptores para LH en las células de la granulosa; esto puede estar explicado por la interferencia del folículo más grande sobre la capacidad de los folículos más pequeños de recibir un adecuado aporte gonadotrópico ya sea por la disminución



de las concentraciones de FSH por debajo del umbral necesario para mantener a los otros folículos o por la capacidad del folículo mayor de secretar inhibinas impidiendo directamente el crecimiento de los demás folículos. En algunos casos los folículos subordinados pueden llegar a ser dominantes si el original folículo dominante se remueve o si se aplica FSH exógena (Motta et al., 2011).

La selección del folículo dominante requiere de otros factores como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) ya que este mantiene el crecimiento folicular al aumentar su receptibilidad ante las células de la granulosa, estimulando el incremento de los receptores de LH y el proceso de aromatización (Tovío & Duica, 2012).

La regresión de un folículo dominante de las primeras ondas de un ciclo estral se debe a una continua supresión de los pulsos de LH como consecuencia de un aumento en los niveles de P4 en la fase luteal, provocando que el folículo dominante se atresie; esto en el caso de que la lisis del cuerpo lúteo no coincida con la dominancia folicular (Colazo & Mapletoft, 2014). Por el contrario, cuando existe el cese de secreción de productos foliculares la FSH circulante comienza a aumentar nuevamente, esta no tiene ningún efecto en el folículo que está en proceso de regresión, pero sí permite el surgimiento de una nueva onda folicular. Al final de la fase luteal la disminución de P4 por la luteólisis permite pulsos de LH estimulando el crecimiento del folículo dominante y aumente la secreción de estrógenos permitiendo un pico de LH y la ovulación (Brito, 2009; Filipiak et al., 2016).

3.2 Multiovlación y transferencia de embriones (MOET)

El concepto de multiovlación y transferencia de embriones (MOET) lo introdujo Smith en 1987 en la Universidad de Guelph (Lonergan & Boland, 2011; Mapletoft & Hasler, 2005), haciendo referencia a aquella herramienta biotecnológica importante para el mejoramiento genético, debido a que permite la multiplicación de material genético de hembras de alto valor de forma rápida, además de facilitar el transporte y comercialización de material genético por medio de los embriones congelados (Baruselli et al., 2011; Medrano et al., 2014; Motta et al., 2011). La



transferencia de embriones consiste en estimular a una vaquilla o vaca la cual se denomina “donadora”, mediante la administración de hormonas exógenas y la posterior inseminación y fertilización natural; siete días después los embriones producidos serán recolectados y transferidos a vaquillas o vacas denominadas “receptoras”, las cuales van a ser previamente sincronizadas mediante tratamientos hormonales (Rodríguez et al., 2011; Vilcatoma, 2018). Esta biotecnología incluye la aplicación de esquemas de superovulación (SOV) en las donadoras que a lo largo del tiempo han presentado diferencias debido a las variaciones en los esquemas farmacológicos de inducción de SOV, sin embargo los resultados no han mejorado y no presentan variaciones importantes a pesar de los intentos de mejorar la técnica (Maldonado & Bolívar, 2008). En el ganado vacuno, las ganancias genéticas pueden aumentarse 30-65% mediante el uso de MOET en hembras de un año para producir crías. En el ganado lechero, la tasa de ganancia genética es un 10-25% más rápido que el uso de un sistema nacional de pruebas de progenie (Lonergan & Boland, 2011).

3.3 Superovulación (SOV)

En los programas MOET el objetivo es recuperar varios embriones por ciclo en una hembra donante por lo cual se recurre al uso de una biotecnología denominada Superovulación (SOV) (Ponce, 2015); básicamente toda la secuencia de los procedimientos involucrados en ET bovina por lo general comienza con la superovulación de la hembra donante (Hasler, 2014; Mogollón & Burla, 2013).

Se denomina superovulación al aumento del número fisiológico de ovulaciones propio de la especie, provocado mediante la administración de gonadotropinas exógenas (Fernandez, 2014; Lamb & Fontes, 2016; Vilcatoma, 2018), cuyo objetivo es obtener el máximo de embriones fertilizados y de la calidad transferible con alta probabilidad de producir gestaciones al mismo tiempo que se garantiza un entorno fisiológico normal en el tracto reproductivo para el desarrollo del embrión (Arriaga, 2010; Castro & Rodríguez, 2014; Kafi & McGowan, 1997). Se considera que hubo respuesta al tratamiento cuando se producen más de dos ovulaciones (Cabodevila



& Torqueati, 2008), pudiéndose obtener de 10 a 20 productos anuales sin la necesidad de gestación ni parto de la hembra élite (Motta et al., 2011). Vacas y novillas que han sido tratadas pueden liberar 10 o más óvulos viables durante un ciclo estral; aproximadamente un 85% de las vacas donadoras fértiles pueden responder a tratamientos de SOV con un promedio de 5 embriones transferibles (Garzón et al., 2007). La SOV se puede resumir como la producción *in vivo* de varios folículos maduros en contraposición a la producción normal de solo uno, estos embriones producidos *in vivo* pueden luego transferirse a las vacas receptoras o crio preservarse (Deguettes et al., 2020).

3.3.1 Variabilidad de la respuesta superovulatoria

La superovulación generalmente produce un promedio de seis embriones utilizables, aunque la variación es asombrosa. Normalmente, no se recuperan embriones del 20-30% de las donantes superovuladas y solo se obtienen de uno a tres embriones de otro 20-30% (Seidel & Seidel, 1991). El número de ovulaciones varía entre 0 y 40 y, además, un 30% de las vacas superovuladas no responden al tratamiento o producen muy pocos embriones de mala calidad; es decir, la respuesta a los tratamientos de superovulación son difíciles de predecir (Becaluba, 2007; Jiménez, 2009).

La variabilidad de la respuesta superovulatoria puede condicionar el éxito de la biotecnología, existe gran cantidad de problemas que se presentan y que potencialmente pueden dar lugar a errores que resulten en una disminución de la respuesta a protocolos de superovulación, o peor aún, en una ausencia total de respuesta (Bó et al., 2011). La gran variación individual en la respuesta ovárica a los tratamientos superovulatorios no ha sido explicada a lo largo del tiempo por lo que se han realizado numerosas investigaciones con la finalidad de comprender mejor dicha variabilidad y tratar de reducirla (Córdova, 1988).

3.4 Factores que afectan la respuesta superovulatoria

En un programa de MOET se encuentran involucrados varios procesos que provocan una alta variabilidad en la respuesta superovulatoria creando muchos



problemas que afectan tanto la eficiencia como la rentabilidad de los programas (Becaluba, 2007; Jiménez, 2009). Los factores que afectan la respuesta superovulatoria de un animal pueden ser clasificados como extrínsecos e intrínsecos (Castro & Rodríguez, 2014) y generalmente la gran variabilidad en la respuesta a los tratamientos hormonales puede ser influenciada por factores relacionados con los tratamientos o, en algunos casos, con factores individuales asociados a las características de la dinámica folicular (González & Mendoza, 2017; Henao, 2010; Mogollón & Burla, 2013).

3.4.1 Factores intrínsecos

Edad

Hasler, (1992), no considera que el factor edad sea una limitante importante para la respuesta superovulatoria lo cual coincide con Lonergan & Boland, (2011); sin embargo cuando animales jóvenes son tratados con dosis elevadas de gonadotrofinas se produce una sobreestimulación ovárica donde muchos folículos comienzan a desarrollarse pero pocos tienen la capacidad de ovular y la mayoría sufre atresia o luteinización (Cabodevila & Torqueati, 2008). De la misma manera al aumentar la edad de la donante puede disminuir el número de ovulaciones, la tasa de fecundación y la calidad embrionaria, lo cual puede estar explicado por el hecho de que existiría una menor disponibilidad de folículos capaces de responder a las gonadotrofinas exógenas usadas en los tratamientos (Fernandez, 2014). Por lo tanto las dosis de gonadotrofinas usadas deberían ser ajustadas de acuerdo a la edad de los animales a tratar (Becaluba, 2007).

Raza

La raza es un factor que tiene relación directa sobre el número total de embriones obtenidos y transferibles (Córdova, 1988). Las razas cebuínas (*Bos indicus*) necesitan menor dosis de hormonas como la FSH a comparación de las razas europeas (*Bos taurus*) (Arévalo, 2014; Vilcatoma, 2018). Además la raza puede estar directamente relacionada con el nivel de estrés de los animales, cuyos niveles elevados se consideran como una limitante en los protocolos de SOV, puesto que



las razas cebuinas están más predispuestas a sufrir estrés durante los tratamientos a comparación de las razas europeas (Mapletoft et al., 2002; Mogollón & Burla, 2013; Seidel & Seidel, 1991; Tribulo et al., 1993).

Es decir, es posible que las diferencias no sean debidas a la subespecie, ya sea *taurus* o *indicus*, sino a variaciones de manejo y ambiente propias de los sistemas de producción de carne y leche (Maldonado & Bolivar, 2008). Además de estudios en animales para producción de carne al aplicar pFSH única inyección subcutánea (SC) detrás del hombro demostró que no difería significativamente del protocolo convencional de 8 inyecciones, sin embargo, la misma inyección SC en vacas Holstein produjo una menor eficacia de SOV que el protocolo de inyección múltiple (Deguettes et al., 2020).

Estado nutricional

El estado nutricional es uno de los factores más significativos debido a que los animales deben ser monitoreados previamente a ser incluidos en los programas de MOET, evitando el excesivo aumento o disminución de la condición corporal (CC) (Palma, 2001). La condición corporal condiciona el rendimiento reproductivo del ganado bovino, la insuficiente nutrición puede producir alteraciones hormonales a nivel de ovario, glándula pituitaria e hipotálamo (Kafi & McGowan, 1997). Del mismo modo la sobrealimentación en vacas es perjudicial para el rendimiento reproductivo ya que animales demasiado obesos acumulan grasa en los ovarios disminuyendo la eficiencia de las drogas (Córdova, 2011; Lonergan & Boland, 2011). Por ende el nivel de energía de la ración puede influir tanto en las tasas de ovulación y fecundación como en la viabilidad de los embriones (Cabodevila & Torqueati, 2008; Fernandez, 2014). La condición corporal óptima para trabajar una vaca y obtener buenos resultados, en una vaca de carne es de 3-3,5 y en una lechera es de 2,5 a 3,0 (Córdova, 2011).

Condiciones fisiológicas

Otros factores considerados importantes están relacionados con el estado



reproductivo del animal (Ponce, 2015), inicio de la nueva onda folicular (Lamb & Fontes, 2016), estado del ovario al momento de iniciar el tratamiento (Cabodevila & Torqueati, 2008), dinámica folicular y características de las ondas foliculares, etc., (Jiménez, 2009).

3.4.2 Factores extrínsecos

Factores tales como periodo del año o la estación, la nutrición, y el semen y su manejo influyen en la respuesta superovulatoria, sin embargo aquellos factores directamente relacionados con las hormonas usadas en los protocolos, pueden afectar la respuesta superovulatoria de una manera directa o indirecta (Jiménez, 2009).

Factor hormona

Existen tres tipos de gonadotropinas que se han utilizado para inducir la superovulación en el ganado: hormona foliculoestimulante (FSH), gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropina menopáusica humana (hMG) (Arriaga, 2010; Mapletoft et al., 2002); las dos últimas hormonas no se usan en los protocolos actuales debido a su alto costo en la práctica veterinaria (Castro & Rodríguez, 2014). Estudios con eCG encontraron que debido a su larga vida media, puede ocasionar presencia de folículos anovulatorios, alteraciones en perfiles endocrinos y mala calidad embrionaria (Cabodevila & Torqueati, 2008); sin embargo el uso de pFSH es el más empleado de los tres tratamientos, ya que su uso arrojó los mejores resultados (Ponce, 2015), a pesar de que su vida media estimada sea de 5 horas o menos, lo cual requiere de aplicaciones constantes cada 12h durante 3 o 4 días (Bó & Mapletoft, 2014). Las hormonas deben ser aplicadas en tiempos previamente establecidos y en cantidades óptimas según los protocolos y animales a usar (Vilcatoma, 2018).

Dosis y pureza de la hormona

Las dosis de FSH se denominan dosis total, la cual va a ser o no dividida en varias aplicaciones; en los protocolos convencionales la FSH se administra de manera



decreciente, dos veces al día manteniendo la regla am/pm durante 3 o 4 días, dependiendo del animal (Yamamoto et al., 1994), el tipo de hormona, la raza, incluso la variabilidad individual (Jiménez, 2009). Se ha determinado que el ganado *Bos indicus* es mucho más sensible a la dosis total de la hormona a comparación del ganado *Bos taurus* (Becaluba, 2007), además inicialmente se tiene una curva donde al aumentar la dosis se aumenta la tasa de superovulación, pero esto llega a un tope posterior al cual la tasa de superovulación disminuye (Jiménez, 2009).

La FSH se realiza basado en un proceso de purificación descrito en 1978, se denomina pFSH ya que se obtiene del extracto de pituitaria de cerdo a través de varios pasos que incluyen precipitación de proteínas, separación cromatografía (intercambio iónico, adsorción, exclusión) y filtración, el polvo final obtenido por este método ha mostrado una alta potencia biológica pero no se ha determinado la pureza de pFSH en comparación con otras proteínas desconocidas (Deguettes et al., 2020). A pesar que la foliculogénesis requiere de FSH y LH los extractos pituitarios contienen diferentes proporciones de FSH y LH que van a afectar la respuesta superovulatoria (Jiménez, 2009), menciona que se ha demostrado que la FSH pura no es adecuada para la superovulación y que se requiere de la presencia de LH en los preparados comerciales para lograr una buena respuesta superovulatoria, pero se debe tomar en cuenta que concentraciones elevadas de LH en una preparación de FSH tiene efectos negativos en la producción y en la calidad de embriones bovinos, el nivel máximo de contaminación con LH debe ser de 15 a 20% (Mogollòn & Burla, 2013).

Vía de administración

Las vías de administración de las hormonas en un protocolo de SOV son la vía IM y SC (Mapletoft et al., 2002), incluso se han probado infusiones continuas por vía intra-arterial (Cabodevila & Torqueati, 2008). A pesar de haber probado diferentes vías de administración, se ha demostrado que la inyección intramuscular genera una mejor respuesta que otras vías, excepto cuando se utiliza una única dosis aplicada vía subcutánea en la zona posterior de la escápula, ya que esto genera



resultados similares a la aplicación intramuscular en dosis decrecientes (Castro & Rodríguez, 2014); sin embargo, estudios como los de Sakaguchi et al., (2018), han probado la administración de FSH por vía epidural la cual arrojó resultados similares a protocolos convencionales. Este tipo de esquema de aplicación sería aconsejable cuando el tratamiento de dos inyecciones diarias durante cuatro días resulta estresante para los animales (Cabodevila & Torqueati, 2008).

Factor altitud

El factor altura sobre aquellos animales criados en un piso altitudinal elevado superior a los 2000 msnm de una u otra forma podría influir sobre la fisiología de los animales, esto debido a la disminución de la presión, puesto que los animales muestran dificultades en cubrir sus necesidades de oxígeno. Ante esta situación, el organismo implementa el aumento del índice de hemoglobina; además, la adaptación del organismo a la disminución de oxígeno se realiza también mediante un aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria, este es un factor que determinará un mejor desempeño reproductivo (Córdova et al., 2010).

3.5 Protocolos para superovulación

Para obtener resultados favorables en los procesos de superovulación en el ganado bovino se debe iniciar con la administración de sustancias exógenas como las gonadotropinas en el momento adecuado del ciclo estral, esto permite sobrepasar los mecanismos inhibitorios fisiológicos que hacen que una vaca ovule uno o dos ovocitos por cada ciclo (Jiménez, 2009), independientemente si la vaca tiene dos o tres ondas foliculares; existen varios ejemplos para poder iniciar un protocolo que pueden involucrar tanto la detección de un celo natural o la sincronización del estro (Mikkola et al., 2020). Autores como Ginther et al., (1989); Lindsell et al., (1986); y Mapletoft et al., (2002), indican que la mejor forma de iniciar un protocolo es alrededor del día 9 a 13 ya que coincide con la aparición de la segunda onda folicular dando así mejores resultados (Chankitisakul et al., 2017). Para poder lograr esta ventana de tiempo se necesita una detección cuidadosa del celo (Mikkola et al., 2020) y además desde el punto de vista práctico no es posible encontrar a vacas en



el mismo día del estro a inicio de una nueva onda folicular (Bó et al., 2011). Para esto se han desarrollado protocolos alternativos con el fin de evitar la detección de celos y prever cualquier error, entre los principales tenemos el uso de estrógeno, ablación folicular y hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Mikkola et al., 2020).

A pesar de que últimamente no ha existido una optimización en protocolos usados en MOET, se han planteado varias alternativas y cambios tanto en las estandarizaciones de las dosis y las vías de aplicación usadas en los protocolos de superovulación. Bó et al., (2018), informó acerca de la aplicación de la dosis única de FSH por vía SC en diferentes regiones del cuerpo del animal (parte posterior del cuello o la parte posterior del hombro), donde estos presentaban tendencia a acumular mayor cantidad de grasa, determinando resultados óptimos en la respuesta superovulatoria generada mediante este método, siempre y cuando aquellos animales sometidos a este tipo de protocolo posean una alta condición corporal.

Del mismo modo se han probado diferentes vehículos para la distribución de la FSH; Yamamoto et al., (1994), propone el uso del polímero polivinilpirrolidona para prolongar la liberación de FSH en el organismo, sin embargo, los resultados presentados fueron contradictorios ya que al replicar el experimento en los animales no hubo respuesta ovárica. Kimura, (2016), informa también acerca del uso del hidróxido de aluminio en gel que genera una respuesta superovulatoria favorable, sin embargo posterior al tratamiento se generaron lesiones como granulomas a nivel del músculo y epidermis, convirtiendo a este método no muy factible. De igual manera Tríbulo et al., (2012), menciona acerca de una dilución de FSH en hialuronano en concentraciones al 2%, 1% y 0,5%, los resultados reflejaron ventajas al momento de superovular con hialuronano al 2%, mencionando que este era un material muy viscoso difícil de homogenizar con la hormona FSH. Todos estos avances han ayudado a establecer nuevas opciones para intentar mejorar los protocolos de superestimulación; Sakaguchi et al., (2018), propone la optimización



de dichos protocolos mediante la administración de la dosis única de FSH por vía epidural, al presentar una respuesta similar a aquellos protocolos convencionales.

3.6 Sincronización de la onda folicular

3.6.1 Sincronización con estrógenos

En países como USA, Nueva Zelandia y los de la Unión Europea, el uso de 17 β -estradiol (BE) está restringido para varias aplicaciones incluida la reproducción (Bó, Tríbulo, et al., 2011), pero en el mercado de América Latina tenemos comercializando benzoato de estradiol, valerato de estradiol y cipionato de estradiol; mismos que se han utilizado con éxito para sincronizar el inicio de una nueva onda folicular, todos estos compuestos varían dependiendo de la vida media en el organismo, como el caso del benzoato de estradiol que tiene una vida media más corta (Mikkola et al., 2020). En los protocolos actualmente incluyen estrógenos (E2) y progesterona P4 que controlan una nueva onda folicular (Soria et al., 2017), por lo tanto la administración de 2,5 mg de benzoato de estradiol más 100 o 50 mg de progesterona por vía intramuscular más un dispositivo intravaginal de progesterona puede ser una alternativa (Bó & Baruselli, 2002; Mapletoft & Bó, 2012; Yáñez et al., 2018). El mecanismo implica la supresión de FSH, y posiblemente LH, lo que resulta en la regresión de los folículos dependientes de gonadotropina (Mikkola et al., 2020), por lo que en un tiempo de 3 a 4 días inicia la liberación de FSH dando así inicio a una nueva onda folicular (Bó et al., 1995).

3.6.2 Sincronización usando ablación folicular

Una alternativa al estradiol es eliminar el efecto supresor del folículo dominante (Mapletoft & Bó, 2012), este método puede ser útil para poder manipular la dinámica de las ondas foliculares ya sea para sincronización de estro, o procesos como recuperación de ovocitos y superovulación (Bó et al., 1995); estudios demuestran que se debe realizar en folículos mayores de 5 mm, pero actualmente con eliminar a los dos folículos más grandes nos sirve para reiniciar una nueva onda (Bó et al., 2006), cuando se elimina el folículo dominante también lo hacen hormonas como la inhibina y el estradiol lo cual resulta en el aumento de FSH y la aparición de una



nueva onda folicular 1-2 días después (Mikkola et al., 2020); el proceso se realiza por vía transvaginal guiada con equipo de ultrasonido y personal capacitado (Bó et al., 2006), lo que puede facilitar el trabajo y reducir los días del protocolo.

3.6.3 Sincronización con GnRH

El tratamiento con un análogo de GnRH provoca una atresia en los folículos antrales o provoca un pico de LH por tanto la ovulación y el inicio de una nueva ola (Bó et al., 1995), que surgirá en 2 días aproximadamente (Mapletoft & Bó, 2012; Mikkola et al., 2020); cabe recalcar que este proceso no inducirá la ovulación en todos los animales cuando estén en una etapa aleatoria del ciclo estral (Mikkola et al., 2020), los porcentajes pueden variar según Colazo et al., (2009), en 44,3% y Pursley et al., (1995), en 85%; por lo que este tratamiento puede ser muy inconsistente para superovulación. Es posible insertar un dispositivo de progesterona en una etapa aleatoria del ciclo estral y se administra GnRH 2 o 3 días después, y posterior comenzar entre 1,5 y 2,5 días después la administración de FSH (Mapletoft & Bó, 2012).

3.7 Protocolos de sincronización en bovinos usados en la región

Actualmente los protocolos tradicionales de SOV tienen algunas limitaciones, incluida la necesidad de una manipulación excesiva de animales y la detección del momento exacto del estro para determinar el momento de la IA, sin embargo, se han diseñado protocolos recientes para controlar la aparición de ondas foliculares, ovulación y permitir el inicio del SOV al momento deseado (Baruselli et al., 2011). Para el desarrollo de SOV están involucrados procesos endócrinos que parten desde el inicio del ciclo estral hasta la ovulación de los folículos dominantes, por lo que estudios previos realizados en nuestra región han permitido desarrollar esquemas de superovulación en vacas donadoras (Soria et al., 2017). Una vez sincronizado el ciclo estral y la onda folicular es momento de empezar con la administración de NIH-FSH-P1 dos veces al día durante 4 o 5 días en dosis decrecientes, ya que promueve una mejor respuesta superovulatoria en ganado bovino que la eCG (Mogollón & Burla, 2013), ya que su tiempo de vida es corto de



tan solo 5 horas (Bó & Mapletoft, 2014; Mogollón & Burla, 2013). Bó & Mapletoft, (2014), determinó un protocolo donde inicia con BE más dispositivo intravaginal de P4 en el día cero para que las hembras no entren en celo tempranamente y dando así como resultado la administración de FSH exógena al día 4; 48 o 72 horas después del inicio del tratamiento, se administra PGF2 α para inducir luteólisis. El estro ocurre en 36 a 48 horas, con ovulaciones que comienzan 24 a 36 horas más tarde (Baruselli et al., 2011; Bó & Mapletoft, 2014).

Los protocolos pueden nombrarse según el tiempo que haya transcurrido entre la primera aplicación de PGF2 α hasta el momento del retiro de los dispositivos de P4, que ocurre antes de la inducción de la ovulación para evitar el efecto nocivo de la alta concentración de P4 en la calidad del embrión durante el período de ovulación. Entonces si la PGF2 α se aplica en el día 6 por la mañana y se retira el dispositivo en el día 7 por la mañana se denomina como “P-24”, pero cuando se retira el día 7 por la tarde se denomina “P-36” estadísticamente no hay diferencias significativa que indique que hay mayor o menor cantidad de embriones, y la inseminación se puede hacer hasta 24 horas después de la última dosis de FSH (Baruselli et al., 2011; Mogollón & Burla, 2013).

3.8 Protocolos alternativos de superovulación

Las altas variaciones en la respuesta superovulatoria siguen representando en la actualidad un inconveniente para la producción de embriones en ganado bovino (Kelly et al., 1997); los protocolos de superovulación más utilizados utilizan FSH purificada extraída de pituitarias porcinas u ovinos, esta ha sido la práctica desde que la FSH desplazó a eCG a fines de la década de 1970. La larga vida media y la alta actividad de la LH de eCG dan lugar a problemas como estimulación ovárica alargada y perfiles endocrinos desviados, folículos no ovulados y calidad del embrión comprometida (Mikkola & Taponen, 2017), sin embargo la vida media de la FSH purificada es muy corta de aproximadamente de 5 horas o menos es por eso que debe administrarse al menos dos veces por día por vía intramuscular en dosis decrecientes para lograr una alta tasa de ovulación (Taşdemir et al., 2012). El



manejo excesivo asociado a frecuentes tratamientos pueden resultar en respuesta superovulatoria reducida ya que pueden provocar estrés en el animal, sin contar el hecho de que se necesita tiempo por parte del médico veterinario (Sakaguchi et al., 2018), o se pueden provocar fallas por mal manejo o errores de la administración (Bó et al., 2018).

Es por esto que la investigación nos ha llevado a poder generar programas de superovulación mediante diferentes alternativas como una sola inyección de FSH o probar por diferentes rutas de administración (Kulus et al., 2019). La liberación de la hormona se ha explorado desde varios enfoques como cambios en el sitio de inyección, la dosis o diluyente liofilizado en la FSH (Mikkola et al., 2020), años atrás se informó de la administración única de extracto pituitario crudo diluido en un vehículo de gelatina-solución salina, indujo una respuesta superovulatoria similar a la de un tratamiento convencional IM; sin embargo, el número de embriones transferibles con este tratamiento fue bastante bajo (Bó et al., 2018).

Otra alternativa válida es variar el lugar de aplicación, estudios han probado en diferentes partes del cuerpo como detrás del hombro del animal, lo que pudo demostrar que puede generar una respuesta superovulatoria pero no tan eficaz como la aplicación de FSH dos veces al día por vía intramuscular, ya que depende de la condición corporal del animal que en el mejor de los casos tiene que ser mayor de 3 y la cantidad de grasa que tenga (Bó et al., 2018). El uso de polímeros es un medio alternativo para la liberación lenta de pFSH después de una única administración IM, como es el caso de la polivinilpirrolidona, polietilenglicol o el hialuronato 2,0% puede ser eficiente cuando se diluye con la hormona, en ganado de carne ha mostrado que hay una SOV comparable con el tratamiento estándar (Mikkola et al., 2020).

Un diluyente muy común que se ha estudiado por Hiraizumi et al., (2015), es el cloruro de sodio (NaCl al 0,9%), que en sus experimentos probaron la administración a dosis única de FSH subcutánea diluida con solución salina en vacas negras japonesas frente a un protocolo de SOV clásico vía IM, cuyo objetivo



fue investigar el efecto de la dosis de pFSH (20 o 30 UA) en combinación con el volumen de solución salina (10 o 50 ml), con la especulación de que si el aumento del volumen de solución salina puede dar lugar a una absorción de pFSH más lenta, porque un gran volumen de solución salina puede requerir un tiempo de absorción mayor que un volumen pequeño, mientras que aumentar la dosis de pFSH podría ayudar a mantener concentración de pFSH en sangre; en donde concluyeron que en los grupos experimentales no hubo diferencias significativas en el número de cuerpos lúteos, óvulos y embriones recogidos, no hubo tampoco hay diferencias en las concentraciones séricas de pFSH en los grupos de animales; por lo tanto una sola administración de pFSH disuelto en solución salina acuosa tiene el mismo efecto superovulatorio que la pFSH dos veces al día durante varios días por vía intramuscular (Kulus et al., 2019).

Una de las alternativas actualmente poco estudiadas y muy prometedoras es la aplicación de 20 UA de FSH disuelta en solución salina por vía epidural específicamente en la vértebras caudales en una sola dosis (Kulus et al., 2019), con este procedimiento se puede fácilmente reducir el número de aplicaciones y la cantidad de hormona administrada, estos estudios garantizan la eficiencia de superovulación y puede ser comparable la aplicación intramuscular de una serie de inyecciones de FSH (una dosis total de 20 UA en 6 dosis decrecientes para 3 días), además demostró que la tasa de blastocistos y blastocistos transferibles en el grupo epidural fue mayor que el del control (Sakaguchi et al., 2018).

Estudios como el de Ochea et al., (2015), indican que en el séptimo día, al aplicar FSH purificada obtenida de la glándula pituitaria porcina (Folltropin-V) se administró de manera mixta: 200 mg por vía epidural y 200 mg intramuscular, comparándolo con el protocolo convencional de inyecciones en dosis decrecientes de FSH, los resultados demostraron que no hay diferencia significativa en la cantidad de folículos por donante y para la cantidad de cuerpos lúteos en el día del lavado al ser valorados por ultrasonografía, por lo tanto se puede decir que este método



alternativo es válido que puede usarse para SOV ya que es más fácil, más rápido y menos estresante para las donantes.

3.9 Tiempo de ovulación

La detección del estro es una de las tareas más difíciles de realizar en cualquier programa de SOV, al momento del estro la oleada de LH endógena y la ovulación son especialmente variables entre vacas donantes superestimuladas (Bó et al., 2006). Por lo tanto, deben considerarse tres aspectos importantes al desarrollar protocolos SOV: 1) control de dinámica folicular y aparición de ondas foliculares; 2) momento de la ovulación e IA en donantes superestimuladas; y 3) tipo (FSH o eCG), dosis y frecuencia utilizados para SOV (Baruselli et al., 2011).

El tiempo de ovulación se puede controlar retrasando la extracción del implante de progesterona y la administración de GnRH/LH al final del protocolo SOV, los cuales se denominan como protocolos P-24 y P36 respectivamente, pues en estudios posteriores se recomienda la aplicación de GnRH o pLH para inducir la ovulación por FTAI en donantes tanto en *Bos indicus* y *Bos taurus* debe realizarse a las 12 y 24 horas, después de la última dosis de FSH (Baruselli et al., 2011). En otras investigaciones al valorar a donadoras que recibieron su última dosis de PG ya sea al día 6 o día 7 las ovulaciones ocurrieron entre las 60 y 108 horas sin diferencia estadística entre los dos grupos, pero sin embargo las vacas que tenían más de cuatro cuerpos lúteos fueron las que tuvieron una ovulación más temprana, esto hace que la detección de celo sea de mayor importancia aun en estos protocolos (Baruselli et al., 2011; Bó et al., 2006). Sin embargo cuando retiramos el DIV el día 7 por la mañana es decir alargar un día más al protocolo convencional y aplicar GnRH el día 8 por la mañana hay mayor cantidad de ovulaciones sincrónicas (Bó et al., 2006).

Es muy importante señalar que cada uno de los experimentos realizados alargando el retiro del DIV mostraron respuestas superovulatorias y una calidad embrionaria aceptable en comparación con los protocolos comunes en ganado de carne, es por eso que el retrasar la eliminación del dispositivo de progesterona desde el día 6,5



al 7 o 7,5 tuvo el mayor efecto en la prevención de ovulaciones tempranas; además de usar ya sea GnRH o pLH para sincronizar la inseminación a tiempo fijo (Bó et al., 2006).

Estudios en vacas Holstein de alta producción difirieron completamente del ganado de carne ya que los resultados de los estudios en donantes de carne *Bos taurus* y *Bos indicus* pueden estar relacionadas con diferencias en la etapa de desarrollo del folículo en el momento en que se indujo la ovulación, se ha demostrado que el diámetro en el que los folículos dominantes difieren de los subordinados ocurre antes y con un diámetro menor en el ganado *Bos indicus* (6,0–6,3 mm) que en el ganado *Bos taurus* de una raza lechera (8,5 mm), además, los folículos adquirieron capacidad ovulatoria con un diámetro mayor en las vacas *Bos taurus* que en *Bos indicus*, las vacas lecheras ovulaban después de la administración de LH cuando los folículos dominantes tenían 10 mm de diámetro. Por el contrario, se ha demostrado en el ganado *Bos indicus* que los folículos ovularán entre 7 y 8,4 mm, es concebible que retrasar el tratamiento con pLH o GnRH fuera beneficioso en las vacas Holstein porque permitió que más folículos alcanzaran la capacidad ovulatoria (Baruselli et al., 2011; Bó et al., 2006).

3.10 Farmacocinética y farmacodinamia de la FSH por vía epidural

Lo que se pretende conseguir cuando se inyecta un fármaco en el espacio epidural es que éste tenga un efecto más intenso y más localizado que cuando es administrado por vía sistémica (Castiñeiras, 2007).

La correcta absorción y distribución de un fármaco aplicado por vía epidural estarán directamente relacionadas con la cantidad de grasa del conducto epidural (Apaza, 2017; Mugabure et al., 2005). Las venas que componen el plexo venoso vertebral al ser relativamente grandes, de paredes delgadas y al no tener válvulas, pueden permitir que la sangre pase en cualquier dirección, las soluciones inyectadas en el espacio epidural se exponen directamente a una gran área de superficie vascular que proporciona las condiciones ideales para una rápida absorción vascular (Lee et al., 2001; Rioja et al., 2013).



Todos los medicamentos colocados en el espacio epidural están sujetos a múltiples destinos potenciales, la mayoría de los cuales disminuyen la probabilidad de que el medicamento llegue a la médula espinal. Los fármacos aplicados por esta vía pueden tener varios destinos:

- a) salir de los agujeros intervertebrales para llegar al espacio muscular paraespinal,
- b) los fármacos pueden difundirse en grasa epidural,
- c) los fármacos pueden difundirse en ligamentos y finalmente,
- d) los fármacos pueden difundirse a través de las meninges espinales (Siafaka, 2012).

Las características fisicoquímicas de los medicamentos, tienen especial importancia para la solubilidad (lipo o hidrosoluble), pues determina gran parte de su farmacocinética y su distribución al torrente sanguíneo. El fármaco tiene que atravesar las meninges para llegar a la circulación periférica los fármacos liposolubles alcanzan antes la médula espinal que los hidrosolubles como consecuencia los hidrosolubles tienen un inicio de acción más lento que aquellos liposolubles, ya que tienen dificultad para atravesar las membranas, una vez que el fármaco atraviesa las membranas (incluyendo las de los plexos venosos), hasta alcanzar la circulación general (Casati, 2003). La FSH es una glicoproteína compuesta por dos subunidades monoméricas de una proteína que está enlazada a una molécula de azúcar. El dímero de proteína tiene dos unidades polipeptídicas, llamadas subunidades alfa (α) y beta (β) (Narváez & Tamay, 2013). Para que el fármaco alcance desde su lugar de absorción su lugar de acción, debe atravesar diversas membranas para llegar a la sangre y para pasar de ésta al líquido intersticial y, en su caso, al interior de las células e, incluso, de estructuras intracelulares. El paso del fármaco de la sangre a los tejidos depende de la fijación del fármaco a las proteínas del plasma (Armijo, 1988); del mismo modo hay que tener en cuenta que las meninges contienen múltiples sistemas enzimáticos, que son potencialmente capaces de metabolizar las drogas (Siafaka, 2012). Las concentraciones plasmáticas de FSH por vía epidural aumentan a partir de 3 horas



después de su administración, con un tiempo de concentración máxima de $5,7 \pm 2,5$ horas después de la administración (Sakaguchi et al., 2020). Posteriormente la hormona se une a los receptores del órgano diana, situados en la célula de la granulosa ovárica. Los receptores de la FSH son polipéptidos de tipo G, de modo que al unirse la FSH a su receptor activa la adenilatociclasa y la proteína-cinasa dependiente de AMPc (Mannaerts et al., 1993; Narváez & Tamay, 2013). También puede ejercer su función mediante la activación de la fosfolipasa C (Herrero et al., 2015).

La farmacocinética de drogas intratecales es poco conocida debido a la dificultad de tomar muestras repetidas de la concentración de drogas en todos los compartimentos (LCR, médula espinal, plasma, espacio epidural, grasa epidural) (Siafaka, 2012).

3.11 Transferencia de embriones

A lo largo del tiempo se han establecido varias biotecnologías reproductivas, las cuales se han ido desarrollando debido a la necesidad de incrementar la productividad pecuaria, principalmente en la especie bovina (Motta et al., 2011). Entre las biotecnologías más aplicadas es la denominada Transferencia de Embriones, la cual tiene como objetivo aumentar el valor genético de la descendencia de animales de alto valor (Maldonado & Bolívar, 2008). La historia de la Transferencia de Embriones en mamíferos inicia con Walter Heape en 1890 quien tomó los embriones de un conejo Angora y los transfirió a una sustituta Belga que posteriormente dio a luz a cuatro crías (Betteridge, 2003; Mapletoft & Hasler, 2005), mientras que fue Umbaug en 1949 quien logró la primera transferencia de un embrión bovino (Hasler, 2014). Sin embargo la primera transferencia y nacimiento exitoso de un embrión de ganado bovino fue registrado en 1951 por parte de Willet (Phillips & Jahnke, 2016).

A pesar del éxito de la Transferencia de Embriones, el interés comercial por la aplicación de dicha biotecnología en el ganado bovino comenzó a inicios de los años 70, aproximadamente 80 años después del primer reporte exitoso de



transferencia de embriones en un mamífero (Hasler, 2003); mientras que la primera transferencia exitosa de un embrión congelado se llevó a cabo en 1973 (Arriaga, 2010). La transferencia de embriones es fundamental para la investigación de cuán profundamente los embriones, fetos y descendencia pueden verse afectados por su entorno más temprano *in vivo* o *in vitro* (Betteridge, 2003). Durante los aproximadamente 40 años de evolución de la superovulación en la especie bovina, el número de embriones viables recuperados por donante no se ha elevado de forma apreciable, en lugar de aumentar el número de embriones transferibles, las mejoras logradas en este campo han facilitado la aplicación de los protocolos, por ejemplo, sincronización de ondas foliculares, IA de tiempo fijo, el bienestar animal y la facilidad de manejo como formulaciones de baja liberación de FSH. El factor limitante más importante en el éxito de la superovulación ha sido y sigue siendo la imprevisibilidad, debido a la alta variabilidad entre individuos (Mikkola & Taponen, 2017).

3.12 Colección de embriones

A finales de la década de 1940 se fueron desarrollando los primeros protocolos de SOV con la recuperación quirúrgica y la transferencia de embriones (Hasler, 2014); la mayoría de los embriones bovinos se recolectaban mediante laparotomía (incisión de aproximadamente 15 cm) en la línea media, por delante de la glándula mamaria o con menos frecuencia, mediante una incisión en el flanco (Seidel & Seidel, 1991), para lo cual fueron necesarias especiales y costosas instalaciones quirúrgicas tanto para las donantes y receptoras que se sometían a cirugía aséptica bajo anestesia general con el riesgo de que (aproximadamente 10%) se volvieran infértiles o subfértiles por la cirugía (Hasler, 2014), puesto que la manipulación quirúrgica del útero y ovarios conducía a lesiones que predisponían a la formación de fibrina y adherencias; sin embargo, a pesar de realizar la técnica con todas las medidas y precauciones necesarias, la colección quirúrgica de embriones podría ser usada como máximo tres veces por animal convirtiéndose en una gran limitante en el uso repetido de la técnica (Palma, 2010).



3.12.1 Recuperación no quirúrgica de embriones

Los avances para desarrollar las técnicas no quirúrgicas empezaron en 1958 y por Sugie en 1965, mientras que el uso del catéter Folley fue reportado por Drost et al., (1976), hoy las recuperaciones de embriones se realizan principalmente con catéteres rígidos y flexibles de 2 y 3 vías, específicamente diseñados que están disponibles en una gran variedad de longitudes y calibres, con puertos ampliados, los cuales pueden esterilizarse en autoclave y reutilizarse repetidamente (Mikkola et al., 2020), simplificando el procedimiento y disminuyendo el trauma uterino.

La técnica de lavado y colección de embriones usada en nuestro medio consiste en introducir la sonda Folley apoyada de un mandril o estilete acerado brindando la rigidez necesaria para atravesar la cérvix y guiar la sonda a cada cuerno uterino. Una vez alcanzada la curvatura mayor del cuerno uterino se retira el estilete y se procede a insuflar el balón con aire o medio. Según las recomendaciones de Rasbech, (1976), el volumen a utilizar oscilaba entre los 12 y 15 ml.

La sonda Folley se conecta a la sonda de doble vía o en “Y” de goma látex o silicona provista de clamps, cuya primera vía se conecta al medio de colección (PBS) el cual estará ubicado en la parte alta del animal (1 metro de altura) y la segunda al filtro colector de malla metálica con poros entre 60 a 90 μm donde serán retenidos los embriones en una cantidad pequeña de líquido (Callejas et al., 2008; Phillips & Jahnke, 2016), de modo que el líquido de colección se recupera en el filtro por gravedad; cada cuerno es lavado con 500 ml de medio (Argudo, 2016; Moore & Hasler, 2017; Robertson, 2015).

3.13 Evaluación y selección de los embriones

La valoración embrionaria se realiza rutinariamente posterior a su recolección y antes de ser transferidos o congelados para su almacenamiento (Phillips & Jahnke, 2016). La evaluación normalmente se realiza colocando los embriones sobre un plato de retención o placa de búsqueda y mediante un microscopio estereoscópico con un aumento de 50 a 100X aumentos (Bó & Mapletoft, 2014). La evaluación morfológica y calidad se basa en criterios como: forma, simetría de blastómeros,

aparición, tonalidad, uniformidad de la membrana, proporcionalidad entre el embrión y el espacio perivitelino, integridad de la zona pelúcida, presencia o no de detritus celulares y compactación de blastómeros entre sí (Palma, 2001)

El diámetro total del embrión bovino oscila entre los 150 a 190 μm , incluyendo un espesor de zona pelúcida de 12 a 15 μm . El diámetro total del embrión permanece prácticamente sin ningún cambio desde la etapa unicelular hasta la etapa de blastocisto (Bó & Mapletoft, 2014). Como embriones transferibles se consideran a aquellos que tienen una alta probabilidad de preñez (60 – 70%) y convertirse en un ternero; estas estructuras serán clasificadas según su estadio de desarrollo y la calidad del mismo a través de códigos estandarizados por la IETS (Argudo, 2016).

3.13.1 Etapa de desarrollo embrionario

La etapa de desarrollo embrionario se determina de acuerdo a los códigos numéricos establecidos por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), los cuales se detallan a continuación:

Ovocito sin fecundar (Código 1): Estructura conocida como UFO, caracterizado por poseer un oolema perfectamente esférico y citoplasma granular.

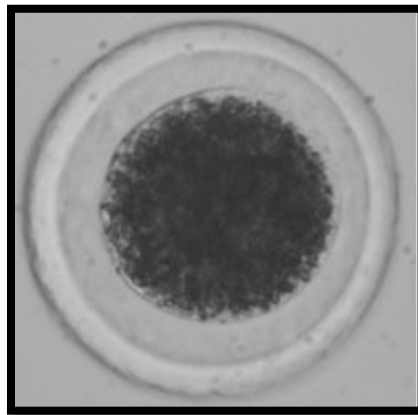


Figura 2: Ovocito sin fecundar
Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016)

Mórula temprana (Código 2): Embrión conformado por 16 o más células, los blastómeros son difíciles de diferenciar entre sí (Phillips & Jahnke, 2016).

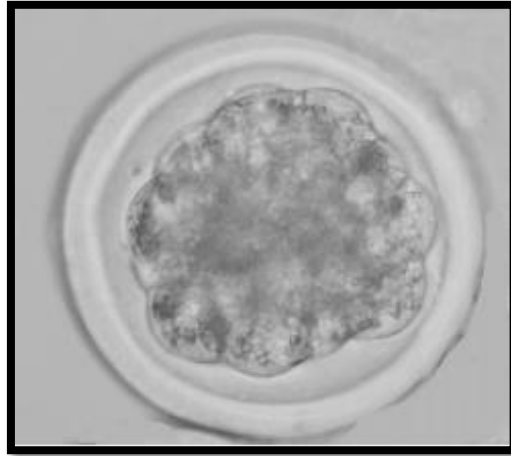


Figura 3: *Mórula temprana*

Fuente:(Phillips & Jahnke, 2016)

Mórula (Código 3): Embrión conformado por al menos 16 células, los blastómeros forman una masa celular compacta y son difíciles de diferenciar entre sí (Bó & Mapletoft, 2014). La masa celular ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

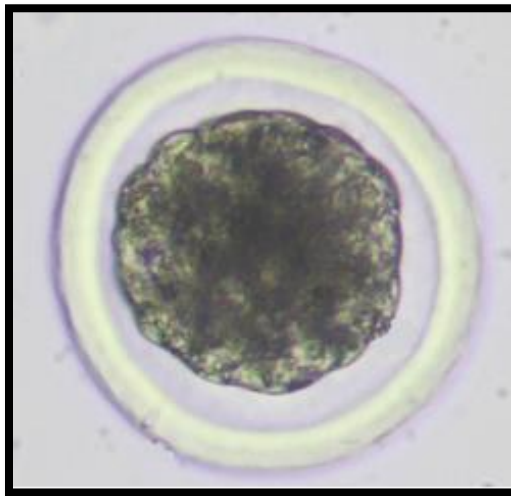


Figura 4: *Mórula*

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016)

Mórula compacta (Código 4): Masa celular compacta formada por la unión de los blastómeros. La masa embrionaria ocupa entre el 60 a 70% del espacio perivitelino.



Figura 5: *Mórula compacta*

Fuente: (Bó & Mapletoft, 2014)

Blastocisto temprano (Código 5): Estructura caracterizada por la formación de una cavidad llena de líquido llamada blastocelo, que da la apariencia general de anillo de sello. El embrión ocupa entre el 70 al 80% del espacio perivitelino.

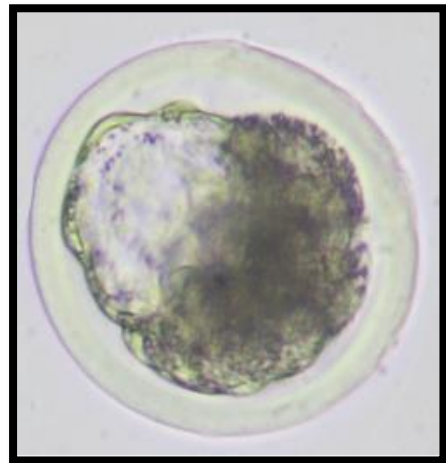


Figura 6: *Blastocisto temprano*

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Blastocisto (Código 6): Estructura embrionaria caracterizada por la diferenciación pronunciada de la capa externa del trofoblasto y la masa celular interna más compacta. El blastocelo es prominente y el embrión ocupa la mayor parte del

espacio perivitelino (Bó & Mapletoft, 2014). En esta etapa embrionaria es posible la diferenciación entre el trofoblasto y la masa celular interna.

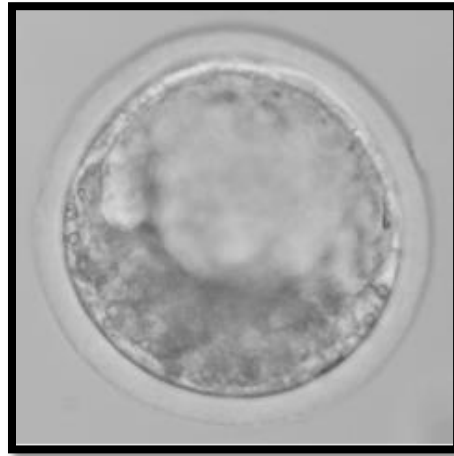


Figura 7: Blastocisto

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Blastocisto expandido (Código 7): Etapa embrionaria caracterizada por un aumento drástico en el diámetro total del embrión, con un adelgazamiento concurrente de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su espesor original.

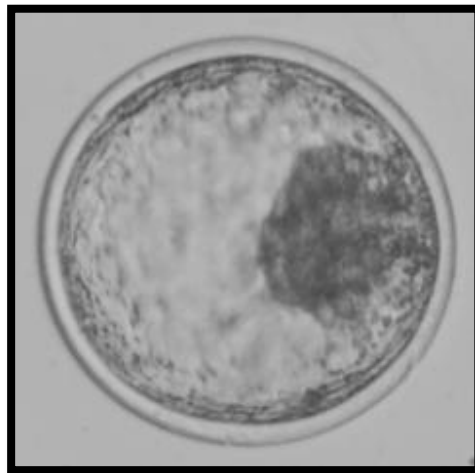


Figura 8: Blastocisto expandido

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Blastocisto eclosionado (Código 8): El embrión se caracteriza por atravesar un proceso de eclosión o se ha desprendido completamente de la zona pelúcida. En esta etapa embrionaria el embrión también puede estar colapsado.

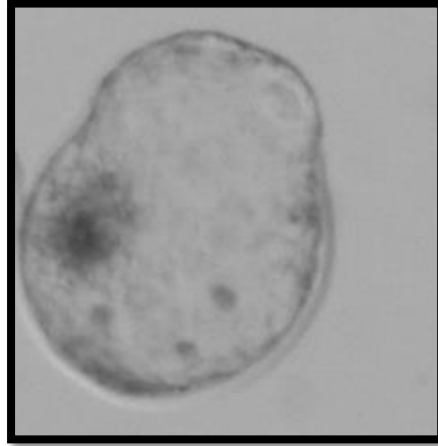


Figura 9: Blastocisto eclosionado

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

3.13.2 Calidad embrionaria

El grado de calidad embrionaria se evalúa de acuerdo a las características morfológicas del embrión. Entre las características determinantes de la calidad embrionaria están el tamaño y el color uniformes de los blastómeros, la presencia o ausencia de vacuolas entre las células, la presencia o ausencia de células extruidas y la forma e integridad de la zona pelúcida (Phillips & Jahnke, 2016). Los códigos de calidad embrionaria también son numéricos y se detallan a continuación:

Excelente o Bueno (Código 1): Los embriones se caracterizan por poseer una masa embrionaria simétrica y esférica, con blastómeros uniformes tanto en tamaño, color y densidad. La zona pelúcida debe ser lisa y no tener superficies irregulares, cóncavas o planas que puedan hacer que el embrión se adhiera a una placa Petri o una pajilla. Al menos el 85% del material celular debe ser una masa embrionaria viable intacta (Phillips & Jahnke, 2016). Los embriones de Código 1 son denominados “Embriones congelables”, ya que sobreviven bastante bien al proceso de congelación / descongelación y son considerados para comercio internacional (Bó & Mapletoft, 2014).



Figura 10: Blastocisto de calidad excelente

Fuente: (Bó & Mapletoft, 2014).

Regular (Código 2): Estos embriones tienen moderada irregularidad tanto en la forma general de la masa embrionaria, tamaño, color o densidad de las células individuales. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta y ser viable. Poseen un grado de supervivencia al proceso de congelación/descongelación menor que aquellos embriones de grado 1. Estos embriones son transferibles en fresco, ya que la tasa de gestación de estos embriones es menor a los de grado 1. Por lo que estos embriones se denominan "Transferibles" pero no "congelables".

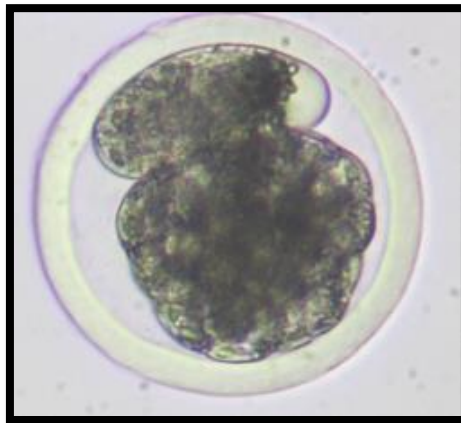


Figura 11: Mórula de calidad regular

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Pobre o Malo (Código 3): Estos embriones tienen irregularidades importantes en la forma de la masa embrionaria, tamaño, color y densidad de las células individuales, al menos el 25% de la masa embrionaria debe estar intacta y ser viable. Estos embriones no sobreviven al proceso de congelación/descongelación y las tasas de gestación son más bajas que las obtenidas con embriones de buena calidad si se transfieren frescos a receptores adecuados (Bó & Mapletoft, 2014).

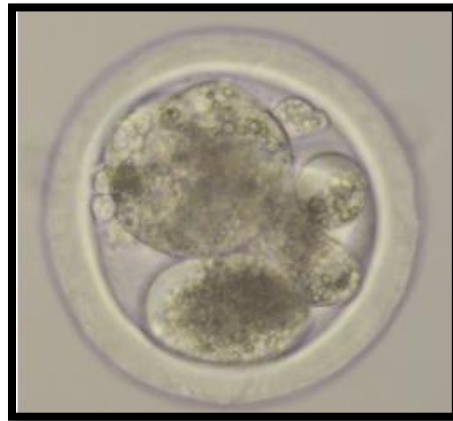


Figura 12: *Mórula de calidad mala*

Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016).

Muerto o Degenerado (Código 4): Estos embriones poseen irregularidades y malformaciones marcadas, tanto en masa embrionaria como en zona pelúcida, lo cual hace prácticamente inviable, por lo que deben ser descartados.

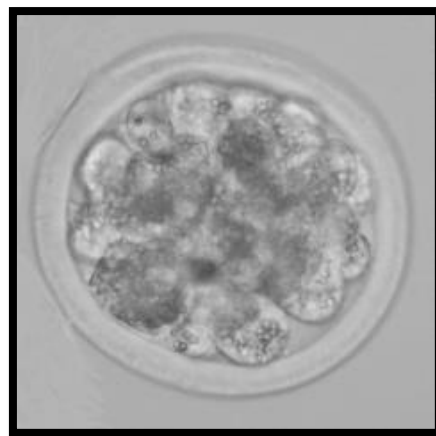


Figura 13: *Embrión congelado*
Fuente: (Phillips & Jahnke, 2016)



4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Materiales biológicos

- Vacas de raza Holstein mestizas
- Pajuelas de semen bovino (Holstein)

4.1.2 Materiales químicos

- Dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR de 1,9 g)
- Benzoato de estradiol (Gonadiol 1 mg/ml)
- Progesterona inyectable (Progesterona 25 mg/ml)
- Prostaglandina (Lutalyse® 25 mg)
- Gonadorelina (Fertagyl 0,1 mg)
- Hormona folículo estimulante FSH (Folltropin® 400 mg)
- Xilacina 2% (Xilazina 2%)
- Lidocaína 2% (Roxicaina 2%)
- Yodo povidona
- Alcohol 70%
- Medio de lavado (ViGRO™ complete flush)

4.1.3 Materiales físicos

- Ecógrafo con sonda lineal 7,5 Hmz (Prosound 2)
- Sistema de lavado de doble vía
- Sonda Folley
- Mandril
- Dilatador
- Jeringas
- Filtro de colección
- Estereoscopio (Nikon SMZ-745T)
- Pipetas

- Cajas petri de búsqueda
- Cajas petri de cuatro pocillos
- Plantillas de campo

4.2 Métodos

4.2.1 Área de estudio



Figura 14: Ubicación del área de estudio (Azuay-Cañar)

Fuente: Instituto Geofísico - EPN, 2020.

De un total de 609 granjas situadas en el trópico alto ecuatoriano, se eligieron 15 ganaderías en base a su ubicación geográfica (sobre los 2500 msnm), temperatura ambiental entre 7 y 18°C, humedad relativa de 80%, y pluviosidad anual entre 800 y 2000 mm³. Todas las granjas poseían sistema de manejo libre, alimentación al pastoreo a base de mezclas de gramíneas (*Pennisetum clandestinum*), y leguminosas (*Lolium multiflorum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*), suplementadas diariamente con heno de gramíneas/leguminosas y sales minerales.

4.2.2 Protocolo de superovulación convencional

El protocolo de SOV convencional (G1), recibió el día 0 un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (DIV; CIDR®; 1,9 g de progesterona; Zoetis, Quito,

Ecuador) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol[®]; Zoetis, Quito, Ecuador), y 50 mg de progesterona inyectable (PG; Progesterona; ERMA, Medellín, Colombia). A partir del cuarto día (18h00) los animales recibieron (60 mg) de FSH (Follitropin; Vetoquinol; Madrid; España): el día 5 (06h00=60 mg; 18h00=40 mg), día 6 (06h00=40 mg; 18h00=30 mg), día 7 (06h00=30 mg; 18h00=20 mg), día 8 (06h00= 20mg). Adicionalmente, el día 6 a las 18h00 y el día 7 a las 06h00 se aplicó 25 mg prostaglandina (PG; Dinoprost Trometamina; Lutalyse[®], Zoetis, Quito, Ecuador). El octavo día por la tarde se observó celo, al día siguiente (día 9), a las 06h00 se realizó la primera inseminación artificial (IA) más la aplicación 0,25 mg de GnRH (Fertagyl; MSD; NJ; EEUU) y a las 18h00 una segunda inseminación (**Figura 15**), el lavado fue realizado el día 16 del protocolo.

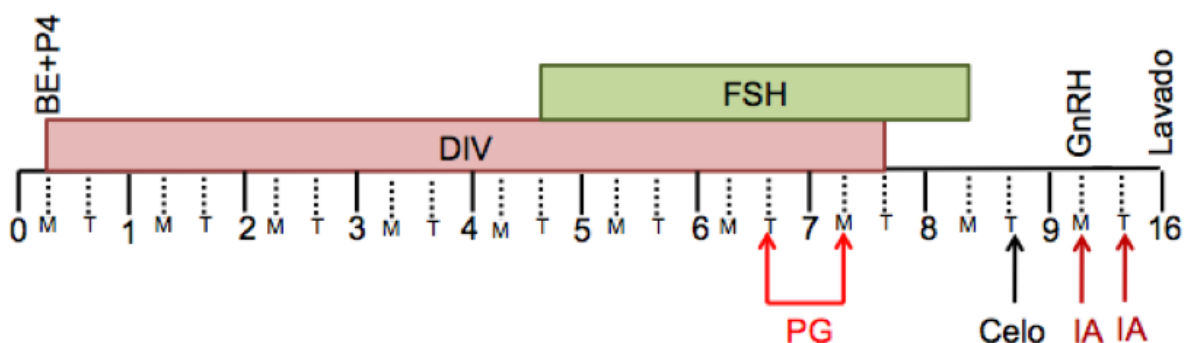


Figura 15: Protocolo de superovulación (SOV) convencional y colección de embriones

4.2.3 Protocolo de superovulación vía epidural

En los animales que recibieron el protocolo alternativo de SOV (G2), se aplicó el día 0 en la mañana (06h00) un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (DIV; CIDR[®]; 1,9 g de progesterona; Zoetis, Quito, Ecuador) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol[®]; Zoetis, Quito, Ecuador), y 50 mg de progesterona inyectable (PG; Progesterona; ERMA, Medellín, Colombia). En la tarde del cuarto día (18h00) las donadoras recibieron una dosis única de FSH (200 mg) diluidos en 5 ml de solución salina por vía epidural, entre el espacio de la última vértebra sacra y la primera coccígea. En el día 6 a las 18h00 y el día 7 a las 06h00 se aplicó 25 mg

de prostaglandina (PG; dinoprost trometamina; Lutalyse[®], Zoetis, Quito, Ecuador). El octavo día por la tarde se observó celo, al día siguiente (día 9), a las 06h00 se realizó la primera inseminación artificial (IA) más la aplicación 0,25 mg de GnRH (Fertagyl; MSD; NJ; EEUU) y a las 18h00 una segunda inseminación (**Figura 16**), el lavado fue realizado el día 16 del protocolo.

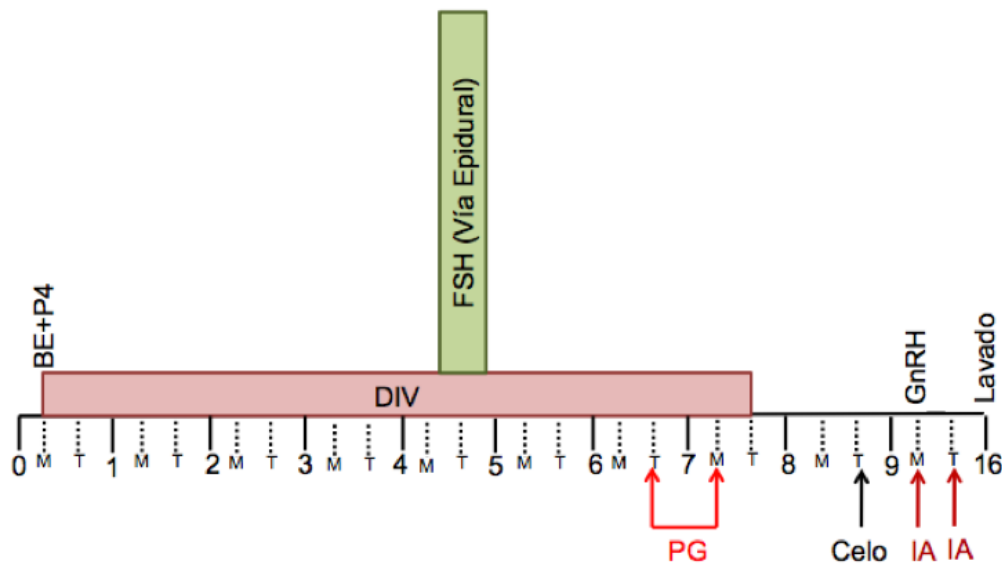


Figura 16: Protocolo de superovulación (SOV) vía epidural y colección de embriones

4.2.4 Valoración de la respuesta superovulatoria

Para valorar la respuesta superovulatoria se cuantificó el número de folículos (>8 mm) presentes en cada uno de los ovarios, mediante ecografía previo a la primera inseminación artificial en la mañana en el día 9 del protocolo de SOV. La ultrasonografía se realizó con un ecógrafo portátil (Prosound 2), provisto de sonda lineal, con una frecuencia de 7,5 MHz, siempre por el mismo técnico.

4.2.5 Valoración de la ovulación dentro del protocolo de SOV

En el día 16, previo a la colecta de los embriones se realizó una ecografía de los dos ovarios para cuantificar el número de cuerpos lúteos presentes en cada ovario.



4.2.6 Recolección de embriones

Preparación del animal previo al proceso de recolección de embriones

Cada uno de los animales en estudio fue colocado en una manga con las respectivas consideraciones de bioseguridad tanto para el operador como para el animal. Luego se procedió a realizar la asepsia y antisepsia del tren posterior de cada vaca con agua y amonio cuaternario. A continuación, se realizó la desinfección del lugar de aplicación del anestésico (mezcla de 4,5 ml de lidocaína al 2% + 0,4 ml de xilacina) por vía epidural (última sacra y primera coccígea).

Recuperación de embriones

La colecta de embriones se realizó el día 16 del protocolo establecido, mediante la técnica no quirúrgica (circuito cerrado). Para lo cual, se pasó la sonda folley a través del cérvix con la ayuda del mandril; luego se localizó la curvatura mayor del cuerno derecho, y se procedió a inflar el balón con la cantidad de aire necesario. Posteriormente se retiró el mandril y se conectó el sistema de lavado de dos vías, una de ellas se conectó al medio de lavado y la segunda vía al filtro de colección. Los embriones fueron recolectados en el filtro y transportados para su evaluación. Este procedimiento se repitió en el cuerno izquierdo.

4.2.7 Valoración de los embriones obtenidos

Una vez realizado el lavado de los embriones estos fueron colocados en una caja petri de búsqueda para ser valorados en un estereoscopio, determinando su grado de desarrollo y su calidad, de acuerdo a los parámetros establecidos por International Embryo Transfer Society (IETS, 2010).

Etapa de desarrollo del embrión

Para la valoración del estadio de desarrollo embrionario se utilizó la nomenclatura de la IETS, a continuación, descrita:

- *Ovocito sin fecundar (código 1)*



- *Mórula temprana (código 2)*: masa que contiene entre 8-16 células, se puede contar las mismas.
- *Mórula (Código 3)*: masa que tiene alrededor de 16 células, siendo difícil de distinguir los blastómeros entre sí, ocupando la mayor parte del espacio perivitelino.
- *Mórula compacta (Código 4)*: los blastómeros se han unido para formar una masa compacta la cual ocupa el 60 – 70 % del espacio perivitelino.
- *Blastocisto temprano (Código 5)*: se ha formado el blastocele y da una apariencia general de un anillo. El embrión ocupa del 70 al 80% del espacio perivitelino. Es difícil diferenciar la masa de la célula interna de las células trofoblásticas en este momento.
- *Blastocisto (Código 6)*: es evidente la diferenciación de la capa trofoblástica externa y de la masa celular interna que es más compacta y oscura. El blastocele es muy prominente, y el embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino. La diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna es posible en esta etapa de desarrollo.
- *Blastocisto expandido (Código 7)*: el diámetro total del embrión aumenta con un adelgazamiento concurrente de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su espesor original.
- *Blastocisto eclosionado (Código 8)*: en esta etapa de desarrollo pueden estar experimentando el proceso de eclosión o pueden haber eliminado completamente la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados pueden ser esféricos con un blastocele bien definido o puede estar colapsado.

Calidad embrionaria

Para valorar la calidad embrionaria se utilizó la nomenclatura de la IETS, brevemente descrita:

- *Excelente o Bueno (Código 1)*: la masa embrionaria es simétrica y esférica, los blastómeros y zona pelúcida uniformes y al menos el 85% de la masa embrionaria debe estar intacta y viable.



- *Regular (Código 2)*: embriones con moderada irregularidad tanto en la forma general de la masa embrionaria y zona pelúcida; al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta y viable.
- *Pobre o Malo (Código 3)*: los embriones tienen irregularidades importantes en la forma de la masa embrionaria y zona pelúcida; al menos el 25% de la masa embrionaria debe estar intacta y viable.
- *Muerto o Degenerado (Código 4)*: embriones con irregularidades y malformaciones marcadas, inviábiles.

4.3 Diseño experimental

Unidad experimental

Se seleccionaron 20 vacas de genotipo Holstein mestizo, peso medio $553,8 \pm 12,82$ kg, condición corporal (CC) de $3 \pm 0,05$, escala de 1-5, según lo descrito por Song et al., (2019), edad media de $5,9 \pm 0,22$ años, multíparas ($3,1 \pm 0,18$ partos), producción láctea media de $19,1 \pm 0,80$ litros, cíclicas, sin problemas reproductivos, con un mínimo de 60 días de post parto.

Durante el desarrollo 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 (OIE, 2019).

Tratamientos

Se compararon dos protocolos de superovulación (SOV):

- G1 (testigo) = Protocolo convencional de SOV, (n=10)
- G2 (protocolo alternativo) = Protocolo de SOV vía epidural, única dosis de FSH, (n=10)

La investigación fue de tipo experimental; teniendo como variable independiente el tipo de protocolo de superovulación utilizado (convencional=G1 vs. alternativo=G2), en los dos se utilizó la hormona folículo estimulante (FSH), el trabajo fue realizado en vacas Holstein mestizas de las provincias de Azuay y Cañar.



Las variables dependientes valoradas fueron: la respuesta a la SOV expresada en número de folículos >8 mm presentes en el día de la IA (día 9), cantidad de CL antes del lavado (día 16) y número y calidad de estructuras obtenidos en G1 y G2. Se toma en cuenta la Granja como una co-variable en el diseño experimental.

4.3.1 Análisis estadístico

Los resultados fueron tabulados en Excel y analizados mediante el programa estadístico SPSS versión 25 (IBM 2019 EEUU). Se determinaron estadígrafos principales. Se ejecutó la prueba de Shapiro Wilk para determinar normalidad de datos. A los valores que mostraron normalidad se les aplicó la prueba de T de Student para comparar las variables cuantitativas (número de folículos, CL y embriones, etc). En el caso de los datos que no poseían normalidad se aplicó prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comparación de CC, peso, edad, número de partos y producción láctea de los animales de los dos tratamientos

Las 20 donadoras que ingresaron al estudio y fueron divididas al azar en dos grupos G1=convencional (n=10) y G2=epidural (n=10), presentaron valores similares en cuanto a edad (6 años), número de partos >3, peso corporal aproximado de 565 kg y condición corporal superior a $2,9\pm 0,05$, con una producción láctea diaria >19 litros (**Tabla 1**). Por lo tanto, podemos afirmar que todos los animales fueron homogéneos en los dos grupos experimentales.

Tabla 1: Valores medios y error estándar de la CC, peso, edad, partos y promedio de leche de las vacas del grupo convencional y epidural.

	Convencional (n=10)	Epidural (n=10)	Valor p
Condición corporal (CC)	2,9±0,05	2,8±0,03	ns
Peso (Kg)	565,3±24,87	597,9±17,81	ns
Edad (años)	6,4±0,63	6,5±0,54	ns
Parto (n°)	3,7±0,39	3,6±0,40	ns
Leche (litros/día/vaca)	20,8±1,40	19,5±0,69	ns

Prueba de Tukey al 5%... n=número de repeticiones por tratamiento.

5.2 Resultados generales del recuento de folículos antrales (RFA) el día 0 (inicio del protocolo)

La media general del recuento de folículos antrales (RFA) de las 20 donadoras evaluadas en esta investigación, al inicio del protocolo de superovulación (día 0), fue de $17,5\pm 0,85$ folículos. Observando un número similar ($P>0,05$) de folículos tanto en ovario derecho como en el izquierdo (**Tabla 2**). Se debe considerar que los 20 animales se encontraban al inicio del protocolo en días diferentes del ciclo estral.

El recuento de folículos antrales (RFA) obtenido en el presente trabajo está en concordancia con los valores establecidos para vacas de raza Holstein ($18,5\pm 9,0$ folículos), alimentadas al pastoreo, en zonas altas de Irlanda (Mossa et al., 2012).



Sin embargo, cuando se evaluó el genotipo Holstein, bajo sistemas de alimentación intensivo basado en el uso de ración totalmente mezclada, en el trópico bajo, se estableció una media de 26 ± 1 folículos (Gobikrushanth et al., 2017). Este resultado es similar ($27,2 \pm 12,2$ folículos) al descrito para vacas Holstein, criadas en condiciones ambientales tropicales húmedas en sistemas de explotación intensivas (Furukawa et al., 2020). Los resultados de estas dos investigaciones presentaron como media de 30,8 y 33,4% más folículos antrales respectivamente, que los observados en el presente trabajo, lo cual conlleva a indicar que el tipo de alimentación, así como el piso altitudinal podrían influir en el RFA al momento del reinicio de la onda folicular, tal como lo describió Gutiérrez et al., (1997), quienes mencionaron que el incremento de la ingesta dietética se encuentra asociada con un mayor número de folículos antrales (37%) presentes en la fase de reclutamiento. Sin embargo, este resultado es contradictorio con lo determinado por Sartori et al., (2016), quienes establecen un menor RFA el día del reinicio de la onda folicular ($12,7 \pm 5,8$ folículos), en vacas Holstein que fueron alimentadas con el 70% de la dieta requerida; sin embargo, cuando la dieta proporcionada fue el 180% el número de folículos antrales ($13,3 \pm 6,1$ folículos) fue similar al presentado por el grupo de animales subalimentados.

5.3 Resultados generales del número de folículos antrales (RFA) que respondieron al protocolo de superovulación en el día 9.

Al evaluar el número de folículos que llegaron a responder a la SOV el día 9 del protocolo, se determinó que el 89,14% de los folículos observados inicialmente (día 0 del protocolo), llegaron a tener un tamaño ≥ 8 mm (**Tabla 2**). Este resultado permite mencionar que la respuesta al protocolo de superovulación del total de donadoras de nuestro trabajo fue buena, ya que autores como Sartori et al., (2001), describen que la SOV busca aumentar el crecimiento folicular con el fin de producir un mayor número de ovocitos fecundables y que para obtener este resultado es necesario que los folículos adquieran capacidad ovulatoria que la adquieren cuando tienen un tamaño medio de 8 mm, (Ginther, 2016).



Tabla 2: Resumen de la media y error estándar de las variables evaluadas durante el protocolo de SOV en el total de animales en estudio ($n=20$).

	Ovario Derecho	Ovario Izquierdo	Total
<i>RFA (inicio protocolo)</i>	8,9±0,44	8,6±0,55	17,5±0,85
<i>Respuesta a la SOV</i>	8,0±0,83	7,6±0,81	15,6±1,52
<i>Tamaño FPO</i>	10,1±0,35	10,2±0,33	10,2±0,32
<i>N° Cuerpos lúteos</i>	6,1±0,78	5,0±0,70	11,1±1,44
<i>Tamaño de CL</i>	13,1±1,21	12,8±1,04	12,9±1,07
<i>N° Folículos anaovulatorios</i>			4,6±0,94
<i>Total de estructuras</i>			6,1±1,01
<i>N° de embriones transferibles</i>			3,8±0,88
<i>N° de UFO's</i>			2,3±0,35

RFA=recuento de folículos antrales. SOV=superovulación. CL=cuerpo lúteo. UFO's=ovocitos no fecundados.

5.4 Resultados generales del número de cuerpos lúteos (CL) observados el día de la colecta de embriones en el día 16.

El día 16 previo a la colecta de embriones mediante ecografía se estableció el número de cuerpos lúteos (CL) presentes en los dos ovarios, determinando que se produjo un 71,15% de ovulaciones; además, estos cuerpos lúteos presentaron un tamaño ≥ 12 mm (**Tabla 2**). Sin embargo, se observó que un 29,48% de folículos que respondieron al protocolo de SOV (15,6±1,52 folículos) no llegaron a ovular (folículos anaovulatorios).

La literatura científica describe que la ovulación se produce como resultado de un pico preovulatorio de LH que desencadena una cascada bioquímica que finalmente termina con la formación de un cuerpo lúteo (Schams & Berisha, 2004); a pesar de que el proceso de ovulación en las donadoras del presente estudio mostró gran variabilidad entre animales, el porcentaje de ovulación general (71,15%) de las 20 donadoras se encuentran dentro de los parámetros descritos por autores como Andino (2014), quien al valorar la respuesta a distintos tratamientos hormonales en vacas lecheras de diferentes razas encontró un 100% de ovulación para vacas Brown swiss, 80% para Jersey y 66,67% para Holstein. Sin embargo, Betancourth



& Cáceres, (2011) obtuvieron un 100% de ovulación al usar Folltropin en vacas de raza Holstein, Pardo suizo y Jersey, lo cual difiere de nuestros resultados.

5.5 Resultados generales del número de estructuras, embriones y UFO's colectados el día 16 del protocolo

En el día 7 post inseminación (16 del protocolo) se realizó la recuperación de embriones mediante técnica no quirúrgica donde se obtuvo 54,95% de estructuras recuperadas en relación con el número de CL observados en los dos ovarios, de estas estructuras el 62,29% fueron embriones transferibles y un 37,70% UFO's (**Tabla 2**).

Los porcentajes de estructuras recuperadas en el presente estudio está por debajo de lo descrito por Naranjo et al., (2019), quienes recuperaron un 76,81% de estructuras en total en vacas Holstein, de las cuales el 55,66% fueron embriones transferibles. Un porcentaje similar de embriones transferibles fue determinado para vacas negras japonesas (Mikkola et al., 2017).

5.6 Recuento de folículos antrales (RFA), valorado el día 0 del protocolo en el grupo convencional y epidural

Al valorar el número de folículos antrales (RFA), presentes el día del inicio del protocolo (día 0) mediante ecografía de ambos ovarios, en los grupos tratados, convencional (G1) y epidural (G2), se determinó que estos fueron similares sin diferencia estadística entre grupos ($P>0,05$; **Figura 17**).

La similitud del RFA en los dos grupos en estudio (G1 y G2), en este momento del protocolo (día 0) guarda concordancia con la selección previa realizada a las 20 donadoras. Sin embargo, los valores medios del RFA de nuestra investigación (**Figura 17**), están muy por debajo de lo establecido para donadoras de raza Holstein, criadas en el trópico bajo, en condiciones de estabulación completa (26 ± 1 folículos) en un momento desconocido del ciclo estral (Gobikrushanth et al., 2017). La explicación a esta diferencia podría estar relacionada a las condiciones medioambientales y alimenticias diferentes que poseían los animales en los dos experimentos referidos.



En este contexto, existe resultados que describen una población de folículos antrales reducida en ovinos criados en lugares a gran altitud, habiéndose demostrado una relación entre la hipoxia hipobárica y la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios, generando problemas en la esteroidogénesis por disminución de la secreción de FSH y LH, lo que influye a su vez en el número y crecimiento de los folículos disponibles (Parraguez & Gonzalez, 2020). Un efecto semejante se ha descrito también en la mujer (Verratti & Di Giulio, 2012).

Lamentablemente, en la especie bovina no hemos encontrado información sobre el efecto específico de la hipoxia hipobárica sobre la fertilidad; sin embargo, estudios previos de nuestro grupo de investigación sugieren que existe cambios en la fisiología ovárica del bovino Criollo en la sierra del Ecuador, relacionado a un menor número de folículos antrales en vacas criadas en regiones semejantes a las del estudio (Ayala et al., 2019) y que podrían estar relacionado al factor altura.

También podrían representar un factor relevante las condiciones nutricionales propias de la zona, caracterizada por el aporte energético reducido (Santos et al., 2008). De hecho, estudios de epigenética (reprogramación) describen que, terneras nacidas de madres con restricción nutricional (60% del requerimiento nutricional, en los primeros 110 días de gestación) presentaron un RFA de $15,8 \pm 1,8$ folículos, en comparación con la descendencia de madres que consumieron el 120% del requerimiento nutricional (RFA= $23,6 \pm 1,9$; Mossa et al., 2013). Estos conceptos son fortalecidos por lo descrito por Ribeiro et al., (2014) quienes determinaron cómo una nutrición deficiente de las madres impacta negativamente sobre el RFA.

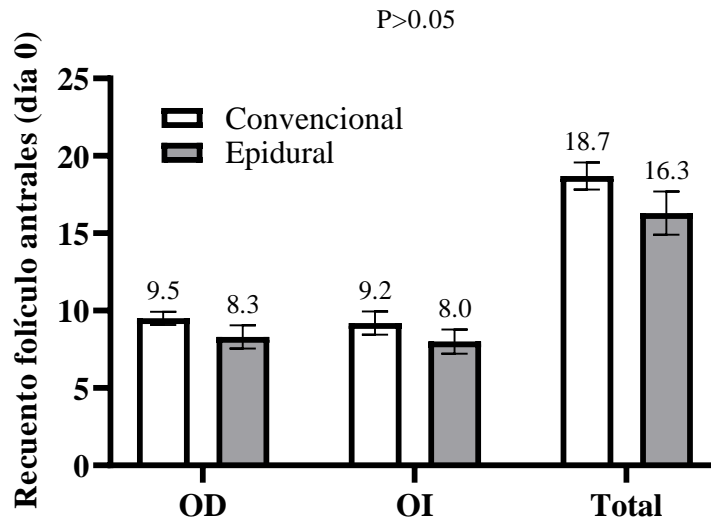


Figura 17: Valor medio del recuento de los folículos antrales (RFA) antes del inicio del protocolo de SOV. Prueba de Tukey al 5%. ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.

5.7 Recuento de folículos antrales (RFA), que respondieron al protocolo de superovulación, convencional (G1) y epidural (G2) valorado el día 9

La respuesta superovulatoria por valoración ecográfica durante el día 9 del protocolo, determinó que el número total de folículos no varió entre tratamientos (G1=17,6±1,93 vs. G2=13,9±2,29; $P > < 0,05$), lo que concuerda con Ochea et al., (2015) quienes al valorar un protocolo de SOV alternativo por vía mixta (epidural e intramuscular) en vacas Holstein y Montbéliarde, obtuvieron un promedio de 14 folículos en la respuesta superovulatoria. Por lo tanto, podemos determinar que la aplicación de FSH por vía epidural en una sola dosis, permitió reclutar e impulsar el crecimiento de un número similar de folículos en los dos grupos G1 y G2 (**Figura 18**). Además, estos resultados concuerdan con lo reportado por Sakaguchi et al., (2018), quienes al usar dosis única de inyección epidural de FSH y comparándola con la administración intramuscular de FSH dos veces al día durante 3 días consecutivos, observaron que el número de folículos no difirió entre los tratamientos (epidural: 15,4±6,0 vs. control: 18,3±7,5). El haber conseguido que el valor medio de folículos antrales que respondieron al protocolo de SOV en el grupo 2 (aplicación de FSH vía epidural en una sola dosis) fuera similar al protocolo convencional (G2)

está relacionado a la vía de administración (epidural), la cual permite una distribución del fármacos de manera más lenta hacia el sistema circulatorio (Bernards, 2002), esto gracias a la cantidad de grasa que poseen el espacio vertebral, así como, la cantidad y disponibilidad de venas epidurales y de la solubilidad de la sustancia aplicada (Lee et al., 2003; Mugabure et al., 2005; Apaza, 2017).

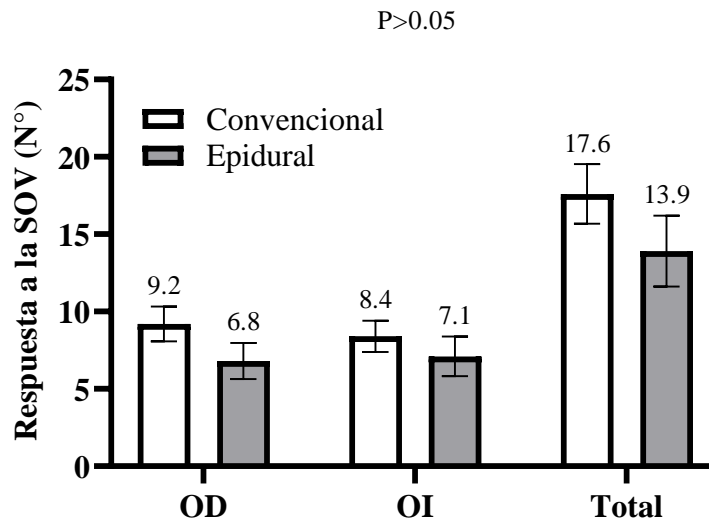


Figura 18: Número medio de folículos que respondieron al protocolo de superovulación (SOV), en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.

De igual manera, se valoró el tamaño de los folículos que respondieron a la SOV en el protocolo convencional ($10,5 \pm 0,49$ mm) y epidural ($9,9 \pm 0,44$ mm), observándose tamaños similares en los dos grupos ($P > 0,05$; **Figura 19**). Estos valores coinciden con lo reportado por Duica (2010), quien determinó una media de $11,6 \pm 0,5$ mm en novillas Holstein. Sin embargo, en la actualidad hay trabajos que mencionan que un folículo con un tamaño igual o superior a 8 mm adquiere capacidad ovulatoria (Ginther 2016). Por lo tanto, consideramos que la FSH aplicada por vía epidural (G2) cumplió su función de estimular el crecimiento de los folículos reclutados en la misma proporción que el protocolo convencional que recibió FSH vía intramuscular (G1).

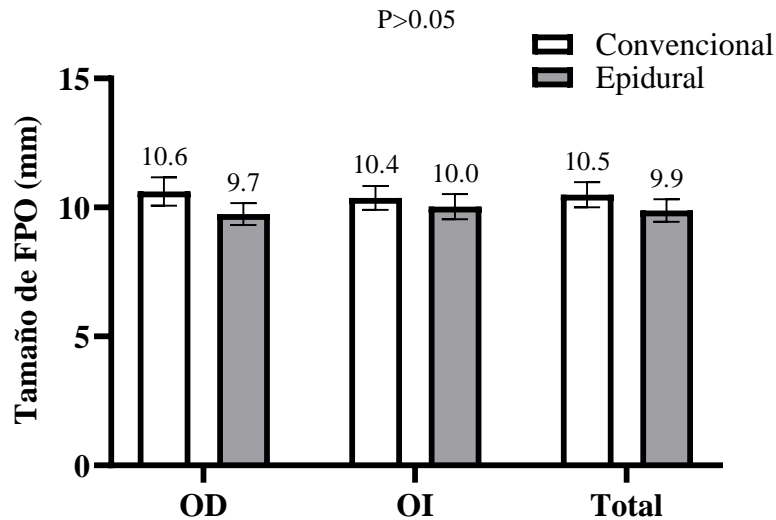


Figura 19: *Tamaño medio de los folículos que respondieron al protocolo de superovulación (SOV), en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.*

5.8 Recuento de cuerpos lúteos (CL), el día 16 del protocolo en el grupo convencional (G1) y epidural (G2)

Se encuentra descrito que posterior a la ovulación se da la formación del cuerpo lúteo (CL), mismo que funciona como una glándula transitoria formada por células de la granulosa y la teca (Niswender et al., 2000). En la presente investigación encontramos que el número de cuerpos lúteos en el protocolo epidural disminuyó significativamente ($P < 0,05$), frente al grupo convencional (G1; **Figura 20**).

En el único trabajo en el que se utilizó la vía epidural en dosis única de FSH para superovular, reportó una media de cuerpos lúteos de $14,4 \pm 5,0$ (vía epidural) y $11,9 \pm 6,3$ (control), sin diferencia estadística entre tratamientos (Sakaguchi et al., 2018). El resultado del grupo control del trabajo de Sakaguchi fue similar al observado en la presente investigación en el grupo 1 (convencional; $14,4 \pm 1,7$ CL); sin embargo, el valor medio de CL del tratamiento epidural descrito por Sakaguchi fue mayor al encontrado en el grupo G1 (epidural) de nuestro trabajo ($7,8 \pm 1,9$ CL).

Los resultados disponibles describen que la utilización de otras vías de aplicación de FSH si bien generan respuesta superovulatoria la respuesta es menor que al utilizar la vía convencional, tal es el caso del trabajo realizado por Ramirez et al., (1993) quienes valoraron la polivinilpirrolidona (PVP) como coadyuvante en el protocolo superovulatorio usando dosis única de FSH por vía subcutánea en vaquillas holstein friesland, determinando que el número de cuerpos lúteos en el protocolo convencional fue superior ($7,6\pm 0,7$ CL) al de FSH-p + PVP ($3,4\pm 0,7$ CL), no obstante los valores encontrados en nuestro estudio tanto convencional ($14,4\pm 1,7$) como epidural ($7,8\pm 1,9$) superan los encontrados por estos autores. Sin embargo, cuando se utilizan dos vías de administración de la FSH el resultado mejora, este es el caso del estudio realizado por Ochea et al., (2015) quienes determinaron que al usar una vía mixta para la administración de FSH (200 mg por vía epidural y 200 mg por vía intramuscular) permitió obtener un promedio de 9 cuerpos lúteos valor superior al observado en el grupo 2 (epidural) del presente trabajo.

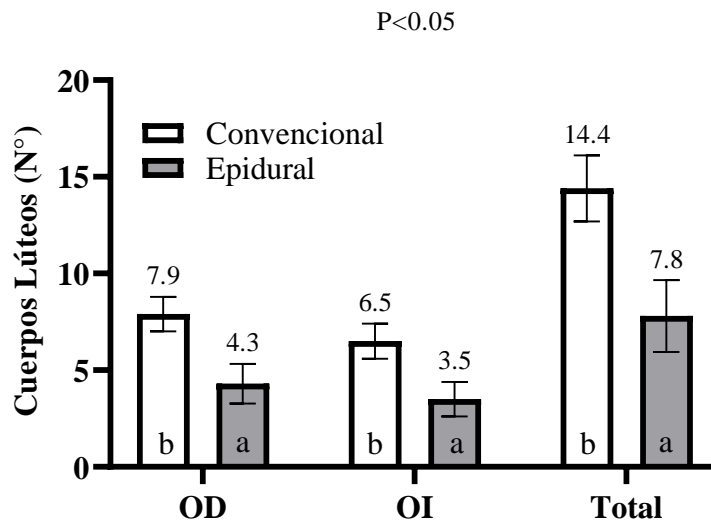


Figura 20: Número medio de cuerpos lúteos observados previo al lavado de embriones, en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.

El CL presenta tres fases: crecimiento, ésta estructura duplica su tamaño entre los días 4 a 7 post ovulación, luego pasa a una etapa de estática hasta el día 16, para luego disminuye de tamaño lentamente durante la fase de regresión esto en forma fisiológica (Herzog et al., 2010).

En nuestro estudio el tamaño de los CL se fue valorado a los 7 días post ovulación, es decir al final de la fase de crecimiento en inicio de la fase de estática, llegando a observarse CL con un valor promedio de $14,8 \pm 1,1$ mm para G1 (convencional), siendo estadísticamente superior ($P < 0,05$) a la media de G2 ($11,1 \pm 1,7$ mm; **Figura 21**).

Los datos encontrados en el presente estudio fue inferiores a los determinados por Ayala et al., (2017), quienes evaluaron el tamaño de CL de vaquillas holstein, brown swiss y criollas en el día 6 post ovulación obteniendo un tamaño medio del CL de $17,5 \pm 0,62$ mm; sin embargo, esto en cuerpos lúteos producto de ovulaciones fisiológicas y los del presente trabajo fueron producto de un protocolo de superovulación.

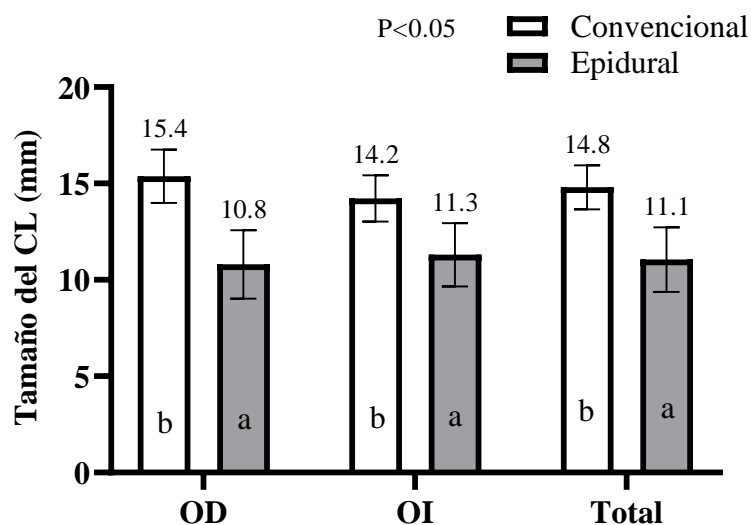


Figura 21: *Tamaño medio de los cuerpos lúteos observados previo al lavado de embriones en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.*



5.9 Recuento de folículos que no ovularon (folículos anovulatorios), el día 16 del protocolo en el grupo convencional (G1) y epidural (G2)

El número de folículos que no llegaron a ovular observados el día 16 en el grupo convencional fue de $2,6 \pm 0,87$ folículos anovulatorios siendo estadísticamente menor a lo encontrado para el grupo epidural ($6,6 \pm 1,46$), **Figura 22**. Este resultado es muy llamativo ya que, si bien la respuesta a la superovulación fue similar en los dos grupos en estudio, el porcentaje de ovulación (número de CL), y el número de quistes foliculares fue menor en el grupo 2 (epidural).

Estos problemas en la ovulación en el grupo que recibió FSH por vía epidural podría relacionarse con la función fisiológica que cumple el estradiol y la inhibina del folículo preovulatorio. Estas hormonas son las encargadas de iniciar una cascada de procesos endócrinos que inducen la ovulación, entre ellos: la atresia de los folículos subordinados; además, de promover la expresión de LHR en las células de la granulosa de los folículos dominantes, en los que aumentan la actividad de la aromatasa en respuesta a gonadotropinas y ejercer un estímulo inhibitorio sobre a liberación de FSH, provocando que los folículos dominantes sea dependiente de la LH para alcanzar el tamaño preovulatorio y ovular (Fricke & Shaver, 2001; Montaña & Ruiz, 2005; Suárez, 2017).

Si bien, no está claro las causas exactas que provocan que un folículo preovulatorio no ovule, se ha llegado a aceptar que dentro del tejido ovárico pueden ocurrir cambios celulares y moleculares durante el crecimiento folicular que podrían contribuir a la anovulación y formación de los quistes, entre estos cambios pueden incluirse: cantidades inapropiadas de receptores hormonales para esteroides o para las gonadotropinas; así como, la alteración en la producción del factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), factor-I y II de crecimiento tipo insulina (IGF-I y II) y el factor de crecimiento endotelial vascular (Chamba et al., 2017).

En este contexto, se encuentra descrito que la utilización de FSH-p disuelta en solución salina 0,9% NaCl para estimular la multiovulación, genera inicialmente un incremento brusco de los niveles de la hormona, para luego disminuir

drásticamente, exponiendo a los ovarios a elevadas concentración de FSH, superiores a los niveles fisiológicos, causando fallos en el desarrollo folicular y la ovulación (Takedomi et al., 1995). Por lo tanto, consideramos que la aplicación de FSH vía epidural en una dosis de 200 mg utilizado en las donadoras del grupo 1 del presente estudio, coadyuvó en los fallos presentados en la ovulación a diferencia del grupo que recibió FSH vía intramuscular (convencional).

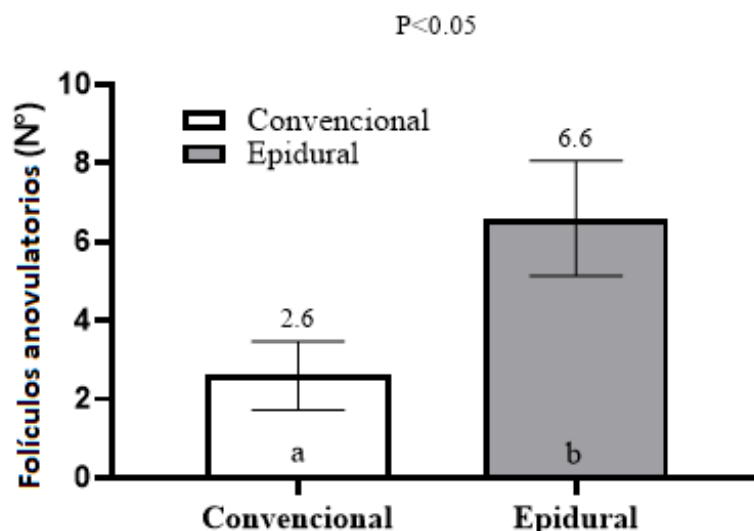


Figura 22: Número promedio de folículos que no llegaron a ovular (folículos anovulatorios), observados previo al lavado de embriones en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.

5.10 Número de estructuras, embriones transferibles y ovocitos no fecundados obtenidos en el grupo convencional (G1) y epidural (G2)

En cuanto al número total de estructuras encontradas se obtuvo un promedio de $8,7 \pm 1,4$ para G1 de los cuales 72,41% fueron embriones transferibles y 27,59% UFO's, difiriendo estadísticamente con G2 para el cual encontramos $3,4 \pm 0,9$ estructuras, 38,24% embriones transferibles y 61,76% UFO's, **Figura 23**.

Al comparar nuestros resultados con el trabajo de Sakaguchi et al., (2018), quienes analizaron dos tratamientos (epidural y control) similares al del presente estudio, se



evidenció que el número de estructuras recolectados ($18,3 \pm 5,4$) y blastocistos transferibles ($9,0 \pm 6,0$) del grupo que recibió FSH vía epidural fue estadísticamente similar al grupo control ($10,9 \pm 7,6$ estructuras; $4,7 \pm 3,5$ blastocistos), estos valores son superiores a los obtenidos en nuestro trabajo.

Sin embargo, al comparar nuestros resultados con trabajos que utilizan protocolos alternativos de SOV, como el realizado por Ramirez et al., (1993), quienes aplicaron una dosis única de FSH, usando como coadyuvante la polivinilpirrolidona (PVP), frente a un grupo control, se describen valores superiores en el grupo control, tanto para estructuras totales recuperadas ($6,9 \pm 1,0$), como embriones transferibles ($4,4 \pm 0,7$), frente al tratamiento alternativo (PVP) que proporcionó $1,7 \pm 0,4$ estructuras y $0,8 \pm 0,3$ embriones transferibles, estos valores son inferiores a los encontrados en el presente trabajo en lo que respecta al número de estructuras ($8,7 \pm 1,40$; convencional y $3,4 \pm 0,89$; epidural), y embriones transferibles ($6,3 \pm 1,26$; convencional y $1,3 \pm 0,59$; epidural).

Con todo, nuestros resultados son inferiores a los obtenidos por Kimura (2016), quienes al utilizar una dosis de FSH en gel de hidróxido de aluminio vía subcutánea llegaron a inducir el crecimiento de múltiples folículos, la ovulación y la producción de embriones ($11,1 \pm 2,5$ estructuras y $9,1 \pm 2,3$ embriones transferibles). Este resultado es corroborado por Hiraizumi et al., (2015) en su trabajo en vacas Negras Japonesas, concluyendo que la administración subcutánea única de 20 o 30 AU FSH-p disuelto en 10 o 50 ml de solución salina fue capaz de inducir una respuesta superovulatoria comparable a la de la administración intramuscular dos veces al día durante 3 días; además, Taşdemir et al., (2012) demostraron que se pueden obtener una respuesta superovulatoria con resultados aceptables con una sola inyección epidural más una inyección intramuscular de FSH en comparación con la inyección dos veces al día de FSH.

Por lo tanto, la obtención de embriones con protocolos alternativos sigue siendo muy discutible y deberían ser profundizados en busca de homogenizar los resultados.

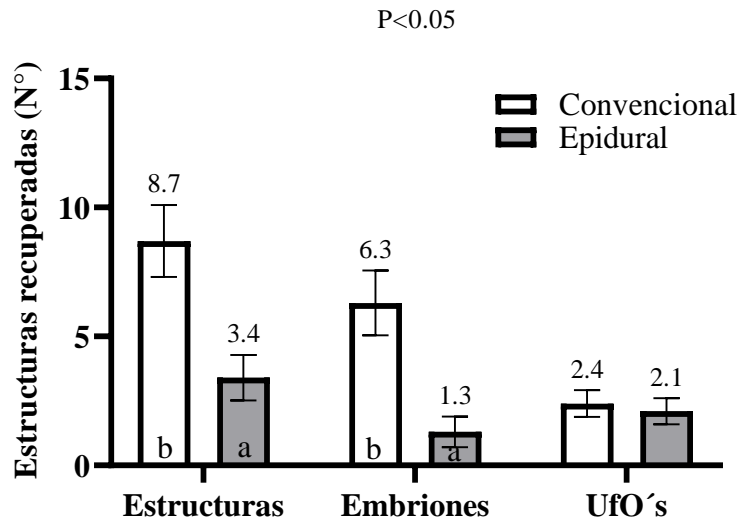


Figura 23: Número promedio de estructuras, embriones transferibles y ovocitos sin fecundar recuperadas luego del lavado en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.

5.11 Calidad de los embriones obtenidos en el grupo convencional (G1) y epidural (G2)

En los protocolos superovulatorios es frecuente encontrar distintos estados de desarrollo embrionario ya que a decir de Palma (2010), la liberación de ovocitos no ocurre de manera simultánea sino en el curso de varias horas por lo cual no son fecundados al mismo tiempo, es así que en la **Tabla 3** se describen los valores encontrados para los distintos estadios embrionarios del presente estudio determinado de acuerdo a los parámetros de la IETS (2016), y revisado por (Phillips & Jahnke, 2016).

El porcentaje de embriones en los diferentes estadios de desarrollo no difirió entre grupos ($P > 0,05$). Para el análisis de los embriones obtenidos se agruparon en mórulas (mórulas tempranas, mórulas y mórulas compactas) y blastocistos (temprano, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto protruido), obteniendo un 53,85% de mórulas y un 46,15% de blastocistos (**Tabla 3**).



Tabla 3: Número promedio de embriones transferibles obtenidos de acuerdo a la calidad de cada uno de estos presentes en los dos grupos (convencional y epidural). Prueba de Tukey al 5%. Ab=letras diferentes indican diferencia entre grupos.

Calidad de los Embriones			
	Tipo		
Mórulas	1	2	3
<i>Convencional</i>	1,4±0,69	1,6±0,88	1,1±0,50
<i>Epidural</i>	0,3±0,21	0,1±0,10	0,3±0,21
Blastocistos tempranos	1	2	3
<i>Convencional</i>	0,4±0,30	0,1±0,10	1,0±0,47
<i>Epidural</i>	0,2±0,20	0,2±0,20	0,1±0,10
Blastocistos (propia mente dicho)	1	2	3
<i>Convencional</i>	0,3±0,21	0,3±0,30	0
<i>Epidural</i>	0	0	0
Blastocistos expandido	1	2	3
<i>Convencional</i>	0,1±0,10	0	0
<i>Epidural</i>	0	0	0

Prueba de Tukey al 5%. Ab= letras diferentes indican diferencia entre grupos.

Al comparar nuestros resultados con otros trabajos que utilizaron protocolos convencionales de SOV como el realizado por Betancourth & Cáceres, (2011) podemos observar que el número de mórulas en sus diferentes estadios de desarrollo (4,65% mórulas, 18,60% de mórula temprana) fueron menores a los encontrados en el presente estudio; sin embargo, los blastocistos obtenidos fueron similares (blastocistos 37,21% y 9,30% de blastocisto expandido).

No obstante hay otros autores como Correa & Heredia (2017), quienes al valorar dos protocolos de superovulación encontraron que el mayor porcentaje de embriones se encontraron en el estadio de mórula (37,29%) y blastocisto (20,34%), independientemente del protocolo de SOV, lo cual concuerda con nuestros resultados.



6 CONCLUSIONES

- La hormona folículo estimulante (FSH), aplicada por vía epidural en dosis única de 200 mg provoca un proceso superovulatorio en número y tamaño de folículos similar al que ocurre cuando se aplica FHS vía intramuscular por ocho dosis cada 24 horas en dosis decrecientes.
- El porcentaje de ovulación obtenido con el protocolo alternativo de aplicación de FSH (epidural) fue menor al observado en el protocolo convencional.
- Al aplicar FSH por vía epidural se obtiene embriones transferibles pero la producción de embriones se reduce hasta en un 79,37% comparado con la aplicación de FSH en forma convencional.
- El uso de FSH por vía epidural como un protocolo alternativo puede ser usado para la estimulación ovárica para la obtención de un mayor número de folículos de tamaño adecuado que podría ser utilizados en otras biotecnologías como los son la punción folicular (OPU), pero no para la producción de embriones *in vivo* en reemplazo de un protocolo convencional.



7 BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, R., Martinez, A., & Pires, R. (2010). *Superovulatory response of zebu cows treated with pFSH in a single subcutaneous injection followed by an additional intramuscular sub-dose 48 h later. Reproduction in Domestic Animals*, 45(3), 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01209.x>
- Andino, P. (2014). *Evaluación de dos programas de superovulación en vacas lecheras*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba.
- Apaza, A. (2017). *Anestesia epidural con la asociación de xilacina y ketamina en ovinos (Ovis aries)*. Universidad Nacional del Altiplano, Puno.
- Arévalo, C. (2014). *Evaluación a nivel de ganado tipo carne (Charolaise) y de ganado tipo leche (Brown swiss) de dos protocolos de superovulación en la producción de embriones en la región amazónica sur del Ecuador*. Universidad Nacional de Loja, Loja.
- Argudo, D. (2016). *Ajste del tiempo de inseminación con semen sexado en vacas superovuladas*. Universidad de Cuenca, Cuenca.
- Armijo, J. (1988). Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En J. Florez (Ed.), *Farmacología Humana* (pp. 47–72). España: Elsevier.
- Arriaga, J. (2010). *Transferencia de embriones en bovinos*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán.
- Atuesta, J., & Gonella, Á. (2011). *Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. Revista Spei Domus*, 7(14), 15–25.
- Ayala, L., Pesantez, J., Rodas, E., Dután, J., Calle, G., Murillo, Y., ... Samaniego, J. (2019). Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Archivos de Zootecnia*, 68(262), 184–190.
- Ayala, L., Pesántez, J., Rodas, E., Méndez, M., Soria, M., Torres, C., ... Pesántez, E. (2017). Tamaño del folículo ovulatorio, cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. *Revista de Producción Animal*, 29(2), 65–72.
- Baruselli, P., Ferreira, R., Sales, J., Gimenes, L., Sá Filho, M., Martins, C., ... Bó, G. (2011). Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76(9), 1583–1593. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.006>
- Bearden, H., & Fuquay, J. (1982). *Reproducción animal aplicada*. México, DF: El Manual Moderno.
- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación en bovino. *Sitio*



Argentino de Producción Animal, 1–18.

Bernards, C. (2002). Understanding the physiology and pharmacology of epidural and intrathecal opioids. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 16(4), 489–505. <https://doi.org/10.1053/bean.2002.0255>

Betancourth, J., & Cáceres, G. (2011). *Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales*. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Tegucigalpa.

Betteridge, K. J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science*, 79(3–4), 203–244. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00166-0)

Bó, G., Adams, G., Pierson, R., & Mapletoft, R. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43(1), 31–40. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00010-R](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00010-R)

Bó, G., & Baruselli, P. (2002). Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en el ganado bovino en regiones subtropicales y tropicales. En C. González-Stagnaro (Ed.), *Avances en la ganadería doble propósito* (pp. 499–514). Maracaibo: Fundación Girarz.

Bó, G., Baruselli, P., Chesta, P., & Martins, C. (2006). The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, 65(1), 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.008>

Bó, G., Guerrero, C., Tríbulo, A., Tríbulo, R., & Mapletoft, R. (2011). Nuevos tratamientos hormonales para la superovulación de donantes de embriones bovinos. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 13(50), 4–25.

Bó, G., & Mapletoft, R. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>

Bó, G., & Mapletoft, R. (2020). Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, 150, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.001>

Bó, G., Rogan, D., & Mapletoft, R. (2018). Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology*, 112, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>

Bó, G., Tríbulo, A., & Mapletoft, R. (2011). Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones en bovinos. *Spermova*, 1(1), 26–33.

Brito, R. (2009). *Fisiología de la reproducción animal con fundamentos en*



biotecnología. La Habana: Félix Valera.

- Cabodevila, J., & Torqueati, S. (2008). Superovulación de hembras bovinas. En G. A. Palma (Ed.), *Biotecnología de la Reproducción* (pp. 79–108). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Callejas, S., Cabodevila, J., Palma, G. A., Alberio, R., Torquati, S., & Butter, H. (2008). Evaluación de los embriones bovinos. En *Memorias del curso de superovulacion y transferencia de embriones bovinos*. Mar de Plata.
- Campo, E., Rizo, J., & García, L. (1985). Evaluación clínica del puerperio en vacas lecheras. *Revista de Salud Animal*, 7, 477–484.
- Carvajal, A., & Martínez, E. (2020). El ciclo estral en la hembra bovina y su importancia productiva. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, (246).
- Casati, L. (2003). *Efecto de la administración epidural de anestésicos locales y opioides sobre la profundidad de la anestesia*. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- Castiñeiras, E. (2007). *Anestesia epidural en los bovinos mediante agonistas alfa dos adrenérgicos y opioides*. Universidad Santiago de Compostela, España.
- Castro, D., & Rodríguez, D. (2014). *Evaluación de factores que afectan la producción de embriones luego de un tratamiento superovulatorio en el ganado bovino en Argentina*. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Chamba, H., Benítez, E., & Pesántez, M. (2017). Factores predisponentes para la enfermedad quística ovárica bovina y su efecto en la eficiencia reproductiva. *Revista de Medicina Veterinaria*, (35), 17–28. <https://doi.org/10.19052/mv.4384>
- Chankitisakul, V., Pitchayapipatkul, J., Chuawongboon, P., Rakwongrit, D., Sakhong, D., Boonkum, W., & Vongpralub, T. (2017). Comparison of three superovulation protocols with or without GnRH treatment at the time of artificial insemination on ovarian response and embryo quality in Thai native heifers. *Tropical Animal Health and Production*, 49(3), 633–639. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1243-6>
- Colazo, M., Gordon, M. B., Rajamahendran, R., Mapletoft, R., & Ambrose, D. J. (2009). Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology*, 72(2), 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.017>
- Colazo, M., & Mapletoft, R. (2014). Fisiología del ciclo estral bovino. *Revista ciencias veterinarias*, 16, 31–46.
- Córdoba, Alejandro, Murillo, A., & Castillo, H. (2010). Effect of climatic factors on bovine reproductive performance in the tropics. *Sitio Argentino de Producción*



Animal, XI(1), 1–12.

Córdova, Ana. (2011). *Protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones en bovinos*. Universidad de Cuenca, Cuenca.

Córdova, L. (1988). Superovulación inducida en Ganado Bovino. *Técnica pecuaria en México*, 26(1).

Correa, E., & Heredia, B. (2017). *Evaluación de la calidad y cantidad embrionaria en respuesta a dos protocolos hormonales de superovulación en vacas Girolando*. Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí.

Deguettes, Q., Fattal, E., Moreau, M., Lego, E., & Bochot, A. (2020). Controlled delivery of follicle-stimulating hormone in cattle. *International Journal of Pharmaceutics*, 590, 119904. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119904>

Del Valle, T. (2008). Dinámica folicular ovárica durante el ciclo estral en vacas doble propósito. En C. González, N. Madrid, & E. Soto (Eds.), *Desarrollo Sostenible de Ganadería Doble Propósito* (pp. 546–554). Fundación Girarz.

Drost, M., Brand, A., & Aarts, M. H. (1976). A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology*, 6(5), 503–507. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(76\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(76)90117-5)

Duica, A. (2010). *Efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Echeverría, J. (2006). Endocrinología Reproductiva: Prostaglandina F2a en vacas. Revisión bibliográfica. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VII(1), 12.

Espinoza, J., Ortega, R., Palacios, A., Valencia, J., & Aréchiga, C. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: Una revisión. *Interciencia*, 32(2), 93–99.

Fernández, Á. (2003). Dinámica folicular: funcionamiento y regulación. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 5(1), 8–12.

Fernandez, E. (2014). *Producción de embriones in vivo en tres razas de ganado lechero*. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.

Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202), 2–2.

Fricke, P. M., & Shaver, R. D. (2001). Manejando trastornos reproductivos en vacas lecheras. *Instituto Babcock. Universidad de Wisconsin*.

Furukawa, E., Masaki, T., Sakaguchi, K., Bo, M., Yanagawa, Y., Ueda, K., &



- Nagano, M. (2020). Relationship between the timing of the first postpartum ovulation and antral follicle counts in Holstein cows. *Journal of Ovarian Research*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-0610-5>
- Garzón, N., Urrego, R., & Andrés Giraldo, C. (2007). Some factors affecting superovulation treatments in cattle embryo transference. *Revista CES / Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2, 68–77.
- Ginther, O. (2016). The theory of follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 57, 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.002>
- Ginther, O., Kastelic, J., & Knopf, L. (1989). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 20(3), 187–200. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90084-5)
- Gobikrushanth, M., Dutra, P. A., Bruinjé, T. C., Colazo, M., Butler, S. T., & Ambrose, D. J. (2017). Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology*, 92, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.018>
- González, E., & Mendoza, I. (2017). *Dos protocolos de superovulación y su efecto en donantes de embriones en vacas mestizas de leche en el trópico*. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Calceta.
- Guáqueta, H. (2009). Ciclo estral: Fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56(3), 163–183.
- Gutiérrez, C., Oldham, J., Bramley, T. A., Gong, J. G., Campbell, B. K., & Webb, R. (1997). The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science*, 75(7), 1876–1884. <https://doi.org/10.2527/1997.7571876x>
- Hasler, J. (1992). Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 75(10), 2857–2879. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78049-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78049-7)
- Hasler, J. (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*, 79(3–4), 245–264. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00167-2)
- Hasler, J. (2014). 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. *Theriogenology*, 81(1), 152–169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Henao, G. (2010). Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en *Bos indicus*. *Rev Fac Nac Agron*, 63(2), 5577–5586.



- Hernández, J. (2016). *Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Herrero, J., Bernabeu, A., & Voskuilen, A. (2015). Hormona Foliculoestimulante. *Editorial Médica Panamericana*, 1–12.
- Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., & Bollwein, H. (2010). Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*, 73(5), 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.016>
- Hiraizumi, S., Nishinomiya, H., Oikawa, T., Sakagami, N., Sano, F., Nishino, O., ... Hashiyada, Y. (2015). Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle-stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over three days. *Theriogenology*, 83(4), 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.012>
- IETS. (2010). *Manual of the international embryo transfer society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary precautions*. (D. Stringfellow, M. Givens, & IETS, Eds.) (4a ed.). Savory.
- Jiménez, C. (2009). Superovulación: Estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Rev. Med. Vet. Zoot*, 56, 195–214.
- Kafi, M., & McGowan, M. R. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*, 48(2–4), 137–157. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(97\)00033-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(97)00033-x)
- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J. F., & Boland, M. P. (1997). Superovulation in cattle: Effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science*, 46(1–2), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01589-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01589-8)
- Kimura, K. (2016). Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: A novel superovulation method for cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 62(5), 423–429. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-066>
- Kulus, J., Wiczorkiewicz, M., Kulus, M., & Jaskowski, J. M. (2019). Superovulation in cattle—searching for the optimal dose, alternative routes of administration and a simplified fsh application program. *Medycyna Weterynaryjna*, 75(9), 515–520. <https://doi.org/10.21521/mw.6216>
- Lamb, G., & Fontes, P. (2016). Donor and recipient management to optimize embryo technology success. *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 197–209.
- Lee, I., Soehartono, R., Yamagishi, N., Taguchi, K., & Yamada, H. (2001). Distribution of new methylene blue injected into the dorsolumbar epidural space



- in cows. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 28(3), 140–145. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2987.2001.00042.x>
- Lee, I., Yamagishi, N., Oboshi, K., & Yamada, H. (2003). Effect of epidural fat on xylazine-induced dorsolumbar epidural analgesia in cattle. *Veterinary Journal*, 165(3), 330–332. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00247-2)
- Lindsell, C., Murphy, B., & Mapletoft, R. (1986). Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, 26(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lonergan, P., & Boland, M. (2011). Multiple ovulation and embryo transfer. *Elsevier*, 2, 41–77. <https://doi.org/10.1201/9780429314032-3>
- Looney, C., Boutte, B., Archbald, L., & Godke, R. (1981). Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology*, 15(1), 13–22.
- Macedo, G., Zúccari, C., de Abreu, U., Negrão, J., & da Costa e Silva, E. (2011). Human-animal interaction, stress, and embryo production in *Bos indicus* embryo donors under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 43(6), 1175–1182. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9820-6>
- Maldonado, J., Agudelo, B., Ginobs, M., & Vázquez, N. (1997). Dinámica folicular en novillas y vacas *Bos indicus* y *Bos taurus* (Revisión de literatura). *Revista Colombiana de Ciencia Pecuarias*, 10(2), 67–75.
- Maldonado, J., & Bolivar, P. (2008). Rational of superovulation and synchronization protocols for bovine embryo transfer ¿Evidence-based therapeutics or lack of ethics? *Revista Colombiana de Ciencia Pecuarias*, 21, 436–450.
- Mannaerts, B., Shoham, Z., Schoot, D., Bouchard, P., Harlin, J., Fauser, B., ... Bennink, H. (1993). Single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human follicle-stimulating hormone (Org 32489*) in gonadotropin-deficient volunteers. *Fertility and Sterility*, 59(1), 108–114. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55624-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55624-6)
- Mapletoft, R., & Bó, G. (2012). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 278–283. <https://doi.org/10.1071/RD11919>
- Mapletoft, R., & Hasler, J. (2005). Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 24(1), 393–403.
- Mapletoft, R., Steward, K. B., & Adams, G. P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 42(6), 601–611. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002046>



- Matamoros, R., & Salinas, P. (2017). *Fundamentos de fisiología y endocrinología reproductiva en animales domésticos*. Santiago: Universidad Santo Tomás.
- Medrano, J., Evangelista, S., Sandoval, R., Ruiz, L., Delgado, A., & Santiani, A. (2014). Aplicación de la técnica no quirúrgica de transferencia de embriones bovinos en un establo de la cuenca lechera de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 25(1), 95–102. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i1.8473>
- Mikkola, M., Hasler, J., & Taponen, J. (2020). Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(lvd), 104–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/RD19279>
- Mikkola, M., & Taponen, J. (2017). Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology*, 88, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.052>
- Mogollòn, È., & Burla, A. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus*, 9(18). <https://doi.org/10.16925/sp.v9i18.545>
- Montaño, E., & Ruiz, Z. (2005). ¿Por qué no ovulan los primeros folículos dominantes de las vacas cebú posparto en el trópico colombiano? *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2), 127–135.
- Moore, S. G., & 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>
- Mossa, F., Walsh, S., Butler, S., Berry, D., Carter, F., Lonergan, P., ... Evans, A. (2012). Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2355–2361. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4325>
- Mossa, Francesca, Carter, F., Walsh, S. W., Kenny, D. A., Smith, G. W., Ireland, J. L. H., ... Evans, A. C. O. (2013). Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biology of Reproduction*, 88(4), 1–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107235>
- Motta, P. A., Ramirez, N. M., Ramos, N., Valencia, A. F., & Perdomo, W. (2011). Respuesta superovulatoria en número y calidad embrionaria de vacas y novillas Gyr lechero en clima cálido húmedo. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12, 1–14.
- Mugabure, B., Echaniz, E., & Marín, M. (2005). Fisiología y farmacología clínica de los opioides epidurales e intratecales. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 12(1), 33–45.
- Fernando Naranjo-Chacón; Felipe Montiel-Palacios; Rodolfo Canseco-Sedano; Concepción Ahuja-Aguirre (2019). Embryo production in middle-aged and



mature *Bos taurus* × *Bos indicus* cows induced to multiple ovulation in a tropical environment. *Tropical Animal Health and Production*. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01975-2> SHORT COMMUNICATIONS.

Narváez, P., & Tamay, M. (2013). *Cuantificación de hormona folículo estimulante, hormona luteinizante y estradiol en mujeres de 45-55 años en etapa de climaterio*. Universidad de Cuenca, Cuenca.

Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., & McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, 80(1), 1–29. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1>

Ochea, M., Pascal, M., Şonea, A., & Bîrţoiu, A. (2015). The effect of epidural administration of FSH in bovine superovulation protocol. *Sci Pap Ser D. Anim Sci*, 58, 217–220.

OIE. (2019). Utilización de animales en la investigación biomédica y médica. *Revista Iberoamericana de Bioética*. <https://doi.org/10.14422/rib.i12.y2020.011>

Palma, G. A. (2001). Producción in vitro de embriones bovinos. En G. A. Palma (Ed.), *Biotecnología de la Reproducción* (pp. 225–294). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Palma, G. A. (2010). Evaluación morfológica de los embriones bovinos. En G. A. Palma (Ed.), *Biotecnología de la Reproducción* (pp. 125–133). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Parraguez, V. H., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Endocrinology of reproductive function and pregnancy at high altitudes. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 11, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.12.006>

Phillips, P., & Jahnke, M. (2016). Embryo transfer (techniques, donors, and recipients). *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 32(2), 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.008>

Ponce, N. (2015). *Transferencia de embriones en ganado bovino*. Universidad Cardenal Herrera, Alfara de Patriarc.

Pursley, J., Mee, M. O., & Wiltbank, M. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*, 44(7), 915–923. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00279-H](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00279-H)

Ramirez, M., Aldana, S., Anta, J., & Valencia, J. (1993). Polyvinylpyrrolidone as a coadjuvant of FSH for superovulation in Holstein Friesian heifers. En *Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*.

Rasbech, N. (1976). Nicht-chirurgische Gewinnung und Übertragung von Rinderembryonen unter PraxisVerhältnissen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 83, 515–



586.

- Ribeiro, E., Bisinotto, R., Lima, F., Greco, L., Morrison, A., Kumar, A., ... Santos, J. (2014). Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6888–6900. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7908>
- Rioja, E., Rubio, L., Monteith, G., & Kerr, C. (2013). Analgesic and motor effects of a high-volume intercoccygeal epidural injection of 0.125% or 0.0625% bupivacaine in adult cows. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 77(4), 273–280.
- Rippe, C. (2009). El ciclo estral. *The Dairy Cattle Reproduction Council*, 111–116.
- Robertson, E. (2015). Embryo collection and transfer. En R. Hopper (Ed.), *Bovine reproduction* (pp. 703–717). John Wiley & Sons.
- Rodríguez, M., Vallejo, A., Batista, P., & Espasandin, A. C. (2011). Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal. *CANGÜE*, 31, 44–50.
- Sakaguchi, K., Ideta, A., Yanagawa, Y., Nagano, M., Katagiri, S., & Konishi, M. (2018). Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black cows. *Journal of Reproduction and Development*, 64(5), 451–455.
- Sakaguchi, K., Tomoko, S., Ninpetch, N., Yojiro, Y., Seiji, K., Koji, Y., & Masashi, N. (2020). Plasma profile of follicle-stimulating hormone after a single epidural administration via caudal vertebrae in cattle. En *Reproduction in a changing world*. Fertility.
- Santos, J., Cerri, R., & Sartori, R. (2008). Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, 69(1), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.010>
- Sartori, R., Fricke, P. M., Ferreira, J. C., Ginther, O., & Wiltbank, M. (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, 65(5), 1403–1409. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1403>
- Sartori, R., Gimenes, L., Monteiro, P., Melo, L., Baruselli, P., & Bastos, M. (2016). Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, 86(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.016>
- Schams, D., & Berisha, B. (2004). Regulation of corpus luteum function in cattle - An overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(4), 241–251. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00509.x>



- Seidel, G., & Seidel, S. (1991). *Training manual for embryo transfer in cattle*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Siafaka, I. (2012). Epidural and CSF pharmacokinetics of drugs. *Pain Therapy and Palliative Care Aretaieion University Hospital*, 1–7.
- Song, X., Bokkers, E., van Mourik, S., Groot Koerkamp, P., & van der Tol, P. (2019). Automated body condition scoring of dairy cows using 3-dimensional feature extraction from multiple body regions. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4294–4308. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15238>
- Soria, M., Soria, C., Argudo, D., Serpa, G., Méndez, S., Torres, C., & Guevara, G. (2017). Superovulación con sincronización de la onda folicular y con celo natural en vacas Holstein. *Revista de Producción Animal*, 29(1), 40–43.
- Stoebel, D., & Moberg, G. (1982). Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 65(1), 92–96. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82157-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82157-7)
- Suárez, G. (2017). Enfermedad quística folicular en hembras bovinas, revisión bibliográfica. *Universidad Cooperativa de Colombia*.
- Sugano, M., & Shinogi, T. (1999). Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Animal Reproduction Science*, 55(3–4), 175–181. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00019-6)
- Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G., & Sasamoto, S. (1995). Superovulation of holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 43(7), 1259–1268. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00097-R](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00097-R)
- Taşdemir, U., Satılmış, M., Karaşahin, T., Kizil, S. H., Kaymaz, M., & Imai, K. (2012). The effect of single epidural plus intramuscular injection of FSH on superovulatory response in Anatolian Black cow. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59(January), 211–216. https://doi.org/DOI: 10.1501/Vetfak_0000002527
- Tovío, N., & Duica, A. (2012). Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. *Revista Spei Domus*, 8(17), 38–47.
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Mapletoft, R., & Bó, G. (2012). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, 77(8), 1679–1685. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.013>
- Tribulo, H., Jofre, F., Carcedo, J., Alonso, A., Tribulo, R., & Bó, G. (1993). Superovulation in bos indicus cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology*, 39, 331.



- Verratti, V., & Di Giulio, C. (2012). High-altitude hypoxia and reproduction: Is there an environmental limit to the human male reproductive system? *Sport Sciences for Health*, 7(1), 39–40. <https://doi.org/10.1007/s11332-012-0110-0>
- Vilcatoma, E. (2018). *Evaluación de la producción de embriones por multiovulación en vacas brown swiss en la estación experimental Santa Ana, Huancayo, en los años 2011-2015*. Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo.
- Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M., & Suzuki, T. (1994). Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 41(3), 747–755. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90184-K](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90184-K)
- Yáñez-Avalos, D. O., Lépez Parra, J. C., Moyano Tapia, J. C., Quinteros Pozo, R. O., & Marini, P. R. (2018). Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas con proestro prolongado de 60 y 72 horas. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 363. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.29503>

8 ANEXOS

Anexo 1: Selección de donadoras



Foto 1: Prueba de enhebrado
Fuente: autores



Foto 2: Recuento de folículos antrales
Fuente: autores



Foto 3: Vaca seleccionada como donadora
Fuente: autores

Anexo 2: Observación y detección de celo



Foto 4: Observación y detección de celo
Fuente: autores

Anexo 3: Valoración de la respuesta superovulatoria



Foto 5: Valoración de la respuesta al proceso de SOV
Fuente: autores

Anexo 4: Valoración de la ovulación



Foto 6: Valoración de la ovulación
Fuente: autores

Anexo 5: Recolección de embriones



Foto 7: Preparación de materiales para el lavado de embriones
Fuente: autores



Foto 8: Preparación de donadora previa al lavado de embriones
Fuente: autores

Anexo 6: Valoración de los embriones obtenidos



Foto 9: Materiales de laboratorio para búsqueda y clasificación de embriones
Fuente: autores



Foto 10: Búsqueda y clasificación de embriones
Fuente: autores

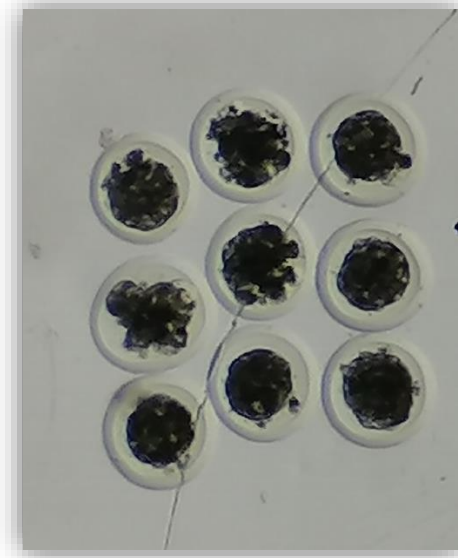


Foto 11: Valoración de embriones colectados
Fuente: autores