

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

### **Influencia de la eCG adicionada al protocolo de sincronización del estro 'J-synch' sobre el crecimiento folicular y titulación de LH en vaquillas Holstein Friesian**

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


#### **Autores:**

Evelin Johanna Lojano Llivichuzhca

Angel Danilo Sibri Méndez

#### **Director:**

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID:  0000-0002-0266-5431

**Cuenca, Ecuador**

2023-05-16

### Resumen

Esta investigación evaluó la influencia de la gonadotropina coriónica equina aplicada al día 6 del protocolo J-synch, sobre la respuesta folicular y la concentración de la hormona luteinizante en vaquillas lecheras Holstein Friesian del trópico alto ecuatoriano. Se usó cuatro vaquillas de 16 a 24 meses de edad, clínicamente sanas y cíclicas. En una primera etapa, se aplicó un protocolo de sincronización de celo "J-synch" que consistió en: día 0, aplicación de benzoato de estradiol (2 mg) + DIV-P<sub>4</sub> (0,5 g); día 6, remoción del DIV-P<sub>4</sub> + prostaglandina F<sub>2</sub>α (500 µg); y día 9 gonadorelina (100 µg). En una segunda etapa, después de 30 días, las vaquillas fueron sometidas al mismo protocolo J-synch con la adición de 400 UI de eCG en el día 6 del protocolo. En ambas etapas se evaluaron en el día 6 hasta el día 10 ecográficamente los folículos dominantes, la ovulación y cuerpos lúteos. Además, a las 50, 55, 60 y 65 h se evaluó la concentración sérica de LH mediante el ensayo de quimioluminiscencia. Los resultados mostraron que solo en una vaquilla (No. 2), en los dos protocolos se sincronizó la onda folicular, registrándose un pico de LH entre 50 h (3,74 mUI/ml) y 55 h (3,88 mUI/ml) y ovulando alrededor de las 72 h después de la remoción del DIV-P<sub>4</sub>. Las otras vaquillas, el protocolo J-synch + 400 UI de eCG provocó codominancia folicular y ovulaciones dobles sin registrar picos de LH entre 50 y 65 horas después de la luteólisis inducida.

*Palabras clave:* proestro, eCG, J-synch, vaquillas, concentración de LH

### Abstract

This research evaluated the influence of equine chorionic gonadotropin applied on day 6 of the J-synch protocol, on the follicular response and the concentration of luteinizing hormone in Holstein Friesian dairy heifers from the Ecuadorian high tropics. Four heifers from 16 to 24 months of age, clinically healthy and cyclical, were used. In a first stage, a “J-synch” heat synchronization protocol was applied, which consisted of: day 0, application of estradiol benzoate (2 mg) + DIV-P4 (0.5 g); day 6, removal of DIV-P4 + prostaglandin F2 $\alpha$  (500  $\mu$ g); and day 9 gonadorelin (100  $\mu$ g). In a second stage, after 30 days, the heifers were subjected to the same J-synch protocol with the addition of 400 IU of eCG on day 6 of the protocol. In both stages, the dominant follicles, ovulation, and corpora lutea were evaluated ultrasound from day 6 to day 10. In addition, at 50, 55, 60, and 65 h, the serum LH concentration was assessed using the chemiluminescence assay. The results showed that the follicular wave was synchronized in only one heifer (No. 2) in the two protocols, recording an LH peak between 50 h (3.74 mIU/ml) and 55 h (3.88 mIU/ml). ) and ovulating around 72 h after the removal of DIV-P4. In the other heifers, the J-synch + 400 IU eCG protocol caused follicular codominance and double ovulations without registering LH surges between 50 and 65 hours after induced luteolysis.











*Keywords:* proestrus, J-synch, eCG, heifers, LH concentration

**Índice de contenido**

Capítulo 1: Introducción .....	14
1.2.1. Objetivo General .....	17
1.2.2. Objetivos Específicos .....	17
Capítulo 2: Revisión de literatura .....	18
2.1 Ciclo estral bovino .....	18
2.2 Eje hipotalámico – hipofisiario – gonadal .....	18
2.3 Fases del ciclo estral .....	19
2.4 Dinámica folicular .....	20
2.5 Protocolos de sincronización convencionales .....	21
2.6 Protocolos de IATF que alargan el proestro .....	22
2.6.1 Protocolo J-synch .....	23
2.6.2 Efecto de la eCG en protocolos de IATF .....	23
Capítulo 3: Materiales y métodos .....	25
3.1 Materiales .....	25
3.1.1 Materiales físicos .....	25
3.1.2 Materiales Biológicos .....	25
3.1.3 Materiales químicos, medicamentos y reactivos .....	25
3.2 Metodología .....	25
3.2.1 Área de estudio .....	25
3.2.2 Diseño experimental .....	26
3.2.3 Animales .....	27
3.2.4 Metodología de la investigación .....	27
Capítulo 4: Resultados .....	31
4.1. Evaluación ecográfica de estructuras ováricas y concentración de LH .....	31
4.1.1. Vaquilla 1 .....	31
4.1.2. Vaquilla 2 .....	32
4.1.3. Vaquilla 3 .....	33

4.1.4. Vaquilla 4 .....	34
4.1.5. Valores promedios de folículos ovulatorios y cuerpos hemorrágicos.....	35
Capítulo 5: Discusión .....	38
Conclusiones .....	43
Recomendaciones .....	44
Referencias.....	45
Anexos .....	58

## Índice de figuras

Figura 1	Diseño experimental. Fuente: Los autores.....	27
Figura 2	Plantilla para el registro de hallazgos ecográficos en el tracto uterino y ovárico de las vaquillas. Fuente: Los autores .....	28
Figura 3	Evaluación ecográfica del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO,  ) , cuerpo hemorrágico (CH,  ) y concentración de la hormona LH en los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG en la vaquilla 1.....	32
Figura 4	Evaluación ecográfica del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO,  ) , cuerpo hemorrágico (CH,  ) , y concentración de la hormona LH en los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG en la vaquilla 2 .....	33
Figura 5	Evaluación ecográfica del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO,  ) , cuerpo hemorrágico (CH,  ) , y concentración de la hormona LH en los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG en la vaquilla 3 .....	34
Figura 6	Evaluación ecográfica del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO,  ) , cuerpo hemorrágico (CH,  ) , y concentración de la hormona LH en los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG en la vaquilla 4 .....	35
Figura 7	Valores promedios del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO,  ) , cuerpo hemorrágico (CH,  ) , de las 4 vaquillas evaluadas ecográficamente durante la aplicación de los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG .....	36

## Índice de tablas

Tabla 1 Tamaño de folículos, tasa de ovulación y tamaño del CH en cuatro vaquillas sometidas al protocolo de sincronización de estro J-Synch con y sin eCG. .... 37

### Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mis hijos, pues ellos han sido la parte medular, se han sacrificado al tener que separarnos; al final terminaron aceptando.

También a mi esposa, con quien formamos este equipo de investigación y valoro muchísimo su aporte, ya que supo darse el tiempo y dedicación a lo que un día soñamos y hoy se vea plasmado.

A mis queridos padres Angel y Celia, quizás un día Uds. lo creyeron imposible, pues no papitos, aquí lo tienen.

A mis hermanos, cuñada y sobrina que siempre estuvieron ahí para darme un consejo o un regaño que ahora siento que me sirvió de mucho, no solo académicamente sino en mi vida personal.

A mis suegros y a mi cuñado, quienes han puesto su confianza en mí persona, pues decirles que nunca les voy a defraudar y ésta es una muestra de lo que soy capaz, sin importar el tiempo ni las dificultades.

A mis familiares, en especial a mi tío Guimo, quien con sus consejos siempre me hacía ver las cosas de diferente manera, en general a todos, porque cada uno de Uds. son parte de este logro.

A mis queridos docentes, en especial al Dr. Andrés Galarza, por darnos la oportunidad de realizar este trabajo y dirigirnos como tutor y a cada uno de los profesores que fueron parte de mi formación académica.

A mis amigos Xavier, Juan, Klever, Fabricio, Paul, Dome, Darío, Angel R. Luis E., Omar, Cisne, Thalía, Diego con quienes un día emprendimos este largo viaje, quizás lleno de incertidumbre; cuan orgulloso me siento al saber que varios ya terminaron, otros vamos en camino y así cumplir esta meta tan anhelada. Para aquellos que se retiraron por diferentes circunstancias de la vida, les aconsejo que no dejen morir sus sueños, regresen con más ganas y entusiasmo, nunca es tarde para estudiar y recuerden que ni la edad, ni una familia son impedimento.

ANGEL DANILO SIBRI MÉNDEZ



## Dedicatoria

Este escalón de mi vida lo dedico a mis hijos y compañero de vida, quienes son mi camino Luis Angel, mi fuerza Angel Sebastián y mi luz mi amado esposo Angel Danilo, quienes llegaron a mi vida para ayudarme a crecer como persona, de corazón y profesionalmente.

A Angel Danilo Sibri Méndez que sin su apoyo y su pasión por la medicina veterinaria me hubiera demorado un poco más en descubrir y entender a esta hermosa carrera.

A mis 2 hijos quienes me enseñaron a que una madre tiene que ser multitareas y que ser madre no es un impedimento para lograr cumplir los sueños y anhelos.

A mis padres Carmela y Luis quienes con su ejemplo de superación me enseñaron a enfrentar muchas adversidades de la vida y a no rendirme en este largo camino y proceso, quienes con su apoyo me brindaron fuerza y creer en que todo es posible.

A mi madre quien me apoyó en seguir esta hermosa carrera sin estar de acuerdo, pero aun así lo hizo, por no soltarme la mano y estar a mi lado desde mis inicios hasta el día de hoy. A mi padre quien se esforzó mucho y sacrificó muchas cosas para que yo hoy pueda estar aquí. Les dedico esta obra a ustedes mis padres por ayudarme a cuidar a mis pequeños y darles todo el cariño que no podía darles cuando estaba en la universidad.

A mi hermano, Julio Cesar, quien me enseñó que con dedicación todo es posible y nada es inalcanzable, quien me enseñó muchas cosas interesantes, mi compañero de juegos, mi maestro y nunca olvidare que gracias a ti logré ingresar a la universidad, te debo mucho hermano mío.

A mis suegros Celia y Angel quienes me dieron aliento cuando tenía miedo, por esas palabras que me decían mucho en cortas frases, por el esfuerzo y sacrificio que pusieron al ayudarme a cuidar a mis pequeños hijos para que yo pudiera cumplir este sueño.

A mis cuñados Angy, Franklin y Gaby por sus buenos deseos, su confianza, ayuda y consejos gracias.

A mis compañeros, amigos y en especial a Lupita, Alexandra, Paola, Erika, Juan con quienes hemos compartido muchos momentos gracias por estar a mi lado siempre, por escucharme y apoyarme.

EVELIN JOHANNA LOJANO LLIVICHUZHCA

## Agradecimientos

Iniciaré agradeciendo al todo poderoso, pienso que todo lo que pasa en la vida, no es casualidad, son decisiones que tomamos mediante la intersección de Él.

Nunca terminaré de agradecer a mis padres, pues ellos son los grandes protagonistas de esta meta, con sus consejos, con su presión hoy podemos culminar y darles esa alegría de la que siempre hablaban que tendrían cuando termináramos. A donde vaya siempre me llevaré ese recuerdo de lo carismáticos que son, me llenan de alegría cada día papitos queridos.

A mi esposa por ser quien puso todo el entusiasmo para finalizar este trabajo de la mejor manera; a mis hijos, pues ellos son la columna vertebral de nuestro hogar y de todas las metas que nos hemos propuesto como hogar.

A mis hermanos, cuñada y a mi sobrina Lucianita por estar ahí cada vez que les he necesitado, gracias por todo el apoyo durante estos años.

Y en general a toda mi familia que de una u otra manera siempre estuvieron ahí cuando más les necesité, por todas las veces que me han ayudado a solucionar los inconvenientes que se han presentado.

A mis suegros y cuñado que se dieron el tiempo suficiente para ayudarnos incondicionalmente, para Uds. esta meta cumplida.

Termino agradeciendo a todos mis docentes, compañeros y amigos que me han apoyado en este trayecto de aprendizaje, vivencias y experiencias que los llevaré en mi corazón

ANGEL DANILO SIBRI MÉNDEZ

## Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme cumplir este gran sueño, sé que todo está en manos de él, pero recuerdo cuando era niña y se le pedí ayudar a los animales y hoy puedo hacerlo a través de esta carrera.

A mis hijos por entenderme cada vez que nos teníamos que separar, por ayudarme a cumplir este sueño.

A mi esposo por apoyarme y darme fuerza cada vez que necesitaba su ayuda, por no soltarme la mano, por ayudarme a formar este equipo.

A mis padres y hermano por creer en mí, apoyarme en todas mis decisiones.

A mis suegros y cuñados por brindarme todo su apoyo y entenderme cada vez que necesitaba su ayuda.

A mis maestros quienes me guiaron, me apoyaron, me aconsejaron, me enseñaron, gracias, este es un paso más que con su ayuda he podido dar.

A mi tutor de esta obra, Dr. Andrés Galarza por ayudarnos, guiarnos, enseñarnos, aconsejarnos, sin su ayuda este proceso hubiese sido mucho más difícil, gracias por ayudarnos a cumplir este sueño.

EVELIN JOHANNA LOJANO LLIVICHUZHCA

## Acrónimos

**IA:** Inseminación artificial

**IATF:** Inseminación artificial a tiempo fijo

**TETF:** Transferencia de embriones a tiempo fijo

**OF:** Onda folicular

**E<sub>2</sub>:** Estrógenos

**P<sub>4</sub>:** Progesterona

**PGF<sub>2</sub>α:** Prostaglandina F2 alfa

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropina

**EB:** Benzoato de estradiol

**ECP:** Cipionato de estradiol

**LH:** Hormona luteinizante

**FD:** Folículo dominante

**eCG:** Gonadotropina coriónica equina

**FSH:** Hormona foliculoestimulante

**DIV:** Dispositivo intravaginal

**CL:** Cuerpo lúteo

**CC:** Condición corporal

## Capítulo 1: Introducción

Los actuales protocolos de cruzamiento y mejora genética del ganado bovino lechero están direccionados a incrementar la producción mediante la obtención de animales genéticamente mejorados (Colazo y Mapletoft, 2014). Para alcanzar este propósito es indispensable el uso de las biotecnologías reproductivas aplicadas en campo, tales como la inseminación artificial (IA), inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) y transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF). La IATF y TETF resultan muy útiles al momento de mejorar la eficiencia reproductiva y, consecuentemente, la producción lechera (Neglia et al., 2003), sin embargo, los elevados costos de estas biotecnologías limitan el uso de los ganaderos.

Los protocolos de IATF han permitido propagar el material hereditario de animales genéticamente superiores, y se utilizan para inseminar un mayor número de vacas sin la detección de celo, disminuyendo la mano de obra y los costos de producción (Bhoraniya et al., 2012). Su uso, sin embargo, todavía sigue constituyendo un hándicap tecnológico debido a las bajas tasas de preñez obtenidas después de la IA (Meléndez et al., 2006). La disminución de la preñez después de la aplicación de un protocolo de IATF, está condicionado principalmente por la respuesta ovulatoria de la vaca, el tipo de hormona usada para la inducción de la ovulación y el momento en que ésta ocurra (Underwood et al., 2010).

Los protocolos de sincronización de celo y ovulación se basan, principalmente, en la sincronización de la onda folicular (OF), la luteólisis y la sincronización de la ovulación (Colazo y Mapletoft, 2014). La asociación de estrógenos (Ej. benzoato, cipionato o valerato de estradiol, [E<sub>2</sub>]) y dispositivos intravaginales de progesterona [DIV-P<sub>4</sub>]) han sido incluidos en los actuales protocolos de IATF para sincronizar la onda folicular de manera efectiva, independientemente si el tipo de ganado tiene 2 o 3 ondas foliculares en el ciclo estral. La sinergia de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> tiene efecto entre 5 y 8 días en un protocolo de IATF (Colazo et al., 2003; Martínez et al., 2005). El reinicio de la onda folicular después de la aplicación de estas hormonas ocurre alrededor del día 3. Los actuales protocolos de sincronización tienden a disminuir a 5 o 6 días de aplicación de P<sub>4</sub> + E<sub>2</sub> (Yáñez-Ávalos et al., 2018). La luteólisis, por otro lado, es inducida mediante la

aplicación de prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>). La PGF<sub>2α</sub> provoca la disminución de la P<sub>4</sub> sérica producida por el cuerpo lúteo, permitiendo que un folículo que esté en selección, desviación o dominancia, termine en ovulación (Colazo y Mapletoft, 2014). Varios productos análogos a PGF<sub>2α</sub> han sido empleados en distintos protocolos de IATF (ej. cloprostenol, dinaprost, etc.) con el propósito de causar luteólisis e iniciar la fase de proestro inducido (Hittiger et al., 2004; Martins et al., 2011). Finalmente, la sincronización de la ovulación en un protocolo de IATF es inducida mediante la aplicación de E<sub>2</sub> o análogos de la hormona gonadotropina (GnRH) (Colazo y Mapletoft, 2014). El benzoato de estradiol (EB) (Barros et al., 2000) o cipionato de estradiol (ECP) (Stevenson et al., 2004) ha demostrado incrementar la frecuencia de pulsos de la hormona LH lo que inducen la ovulación. En vacas con un folículo dominante (FD) en crecimiento (>10 mm de diámetro), la aplicación de GnRH induce la liberación de LH y la ovulación (Pursley et al., 1995). A pesar de que los efectos de estas hormonas se conocen en diferentes razas bovinas, aún siguen existiendo respuestas de carácter variado en distintos protocolos de IATF; estas distintas respuestas causan un fallo en la sincronización de la ovulación, del momento exacto de la inseminación y, en consecuencia, una reducción de la fertilidad.

Para incrementar la tasa de ovulación y la tasa de preñez, los actuales protocolos de IATF tienden a incrementar el tiempo de proestro (desde la luteólisis y retiro del dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> hasta la IA) usando la gonadotropina coriónica equina (eCG). La gonadotropina coriónica equina (eCG), es de origen equino y pertenece a la misma familia de hormonas glicoproteicas que la LH, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH). La administración de 400 a 500 UI de eCG en el ganado lechero da como resultado menos folículos atrésicos, el reclutamiento de más folículos pequeños que muestran una tasa de crecimiento elevada, el crecimiento sostenido de folículos medianos y grandes, y un mejor desarrollo del FD y preovulatorio. El uso de la eCG para mejorar la calidad del folículo ovulatorio ha demostrado que mejora la calidad de folículo, y por lo tanto, mejora la calidad y funcionalidad del cuerpo lúteo (mayor tamaño y producción de P<sub>4</sub>). En base a estas características, el tratamiento con eCG se utiliza en la reproducción para controlar la actividad reproductiva de la vaca (a) mejorando el rendimiento

reproductivo durante las primeras etapas posparto; (b) aumentar las tasas de ovulación y preñez en vacas no cíclicas; (c) mejorar la tasa de preñez en vacas que muestran retraso en la ovulación; y finalmente, (d) la eCG está actualmente incluida en los protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo, ya que después de inducir la sincronía de la ovulación, la eCG tiene efectos beneficiosos sobre el desarrollo y la supervivencia del embrión (Rensis et al., 2014).

En base a los efectos benéficos de la eCG, se han diseñado nuevos y novedosos protocolos de IATF. El protocolo 'J-synch' es un protocolo de IATF innovador que usa eCG al momento de la luteólisis inducida y que ha demostrado resultados promisorios de fertilidad en vaquillas de carne (Ej. *Pardo Suizo x Bos indicus*, Braford, Angus). El protocolo J-synch inicia con la sincronización de la onda folicular aplicando EB y P<sub>4</sub> intravaginal durante 6 días; seguido de PGF<sub>2</sub>α (500 µg) + gonadotropina coriónica equina (eCG, 400 UI), y a las 60 a 72 horas de inducirse la luteólisis, de la IATF con una dosis reducida de GnRH (100 µg de gonadorelina) (Bó et al., 2019; Mion et al., 2019; Re et al., 2014; Yáñez- Ávalos et al., 2018). Un estudio reciente determinó que el protocolo J-Synch más 400 UI de eCG aplicado a vacas *Brown Swiss* con un proestro inducido de 60 y 72 horas tuvieron diferente comportamiento en el desarrollo folicular y en el tamaño del cuerpo lúteo, sin embargo, el porcentaje de preñez no difirió entre los tratamientos (Yáñez-Avalos et al., 2021). Hasta donde nosotros conocemos, el protocolo J-synch + eCG no ha sido validado en vaquillas Holstein Friesian en condiciones de pastoreo en el trópico del altiplano ecuatoriano.

En base a toda la información mencionada anteriormente, nosotros nos planteamos la hipótesis de que el protocolo J-synch podría ser útil en vaquillas Holstein Friesian. La aplicación de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> (durante 6 días) lograría la sincronización de la OF, y luego de inducir la luteólisis con PGF<sub>2</sub>α, podríamos incluir 400 UI de eCG y 72 h más tarde se podría tener una respuesta ovulatoria satisfactoria con una mejor calidad (tamaño) de folículo ovulatorio. Esto supone que los niveles séricos de LH ascenderían a su máxima frecuencia de pulsatilidad en las siguientes 48 h, y entonces, a las 72 h terminaría en la ovulación. Sin embargo, para determinar la eficacia del protocolo, es necesario monitorear ecográficamente el crecimiento del FD y, concomitante a esto,



medir la concentración de la hormona LH a las 50, 55, 60 y 65 horas del proestro inducido por el retiro del DIV-P<sub>4</sub> y la aplicación de PGF2 $\alpha$ . 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la gonadotropina coriónica equina (eCG) aplicada al momento de retirarse el dispositivo intravaginal de progesterona y a la aplicación de prostaglandina sobre la respuesta folicular y de la hormona luteinizante (LH) en vaquillas lecheras Holstein Friesian de la sierra sur oriental ecuatoriana, sincronizadas con el protocolo 'J-synch'

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar las concentraciones séricas de LH a las 50, 55, 60 y 65 horas de inicio del proestro inducido del protocolo J- synch con y sin eCG.
- Medir el crecimiento del folículo dominante (FD) durante la fase del proestro del protocolo J-synch con y sin eCG
- Determinar el momento de la ovulación de vaquillas sincronizadas con el protocolo J-synch con y sin la administración de eCG.

### 1.3. Preguntas de investigación

- Pregunta 1: ¿La titulación máxima de concentración de LH sérica es producida dentro del rango de 50, 55, 60 y 65 horas (aproximadamente, 24 h antes de la ovulación) de iniciar el proestro inducido del protocolo J-synch?
- Pregunta 2: ¿La eCG permite mejorar la respuesta hormonal (LH) y folicular de vaquillas Holstein Friesian sometidas a un protocolo de IATF J-synch?

## Capítulo 2: Revisión de literatura

### 2.1 Ciclo estral bovino

El ciclo estral bovino es de gran importancia para las ganaderías ya que de esta depende en gran medida la rentabilidad de ésta, considerando que se puede incrementar la eficiencia del manejo reproductivo (Sirois y Fortune, 1990). Las vacas son poliéstricas continuas, es decir que presentan ciclos estrales todo el año, presentando el primer ciclo al año y medio de vida, considerando que esto va a depender del manejo, condición corporal, genética y alimentación (Jiménez, 2019).

El ciclo estral inicia en una vaquilla al alcanzar su pubertad, dando la oportunidad de que la vaquilla o vaca quede gestante; hay que considerar que el ciclo estral se encuentra definido entre un celo y otro, es decir entre un estro y estro, el cual tiene un rango entre 18 y 24 días con un promedio de 21 días, de esta manera la reproducción en vacas se considera normal si los ciclos se presentan en este período de tiempo (Perry, 2020).

Durante cada ciclo estral hay cambios hormonales que controlan las ondas de crecimiento folicular, hasta que un folículo llegue a ovular y posterior empiece la formación del cuerpo lúteo el cual inhibe la liberación de gonadotropinas a través de la secreción de progesterona (Parish, 2016).

### 2.2 Eje hipotalámico – hipofisiario – gonadal

La funcionalidad del sistema reproductor depende del hipotálamo y de la adenohipófisis comunicados a través del sistema porta hipotálamo hipofisiario que es un sistema circulatorio local; considerando que la actividad de la hipófisis se encuentra controlada por las hormonas peptídicas las cuales son secretadas por el hipotálamo, estas hormonas se conducen hacia la hipófisis, a través de los axones neurales (Hernández, 2012).

Considerando que del hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la misma que al llegar a la hipófisis anterior (adenohipófisis). A la adenohipófisis llega la GnRH mediante el eje porta-hipotálamo-hipofisiario, de esta manera la adenohipófisis secreta hormonas de gran importancia para la reproducción;

como son la FSH, LH y prolactina, por ende, se dice que la FSH y LH intervienen en el crecimiento y ovulación de los folículos, siendo la LH la encargada de la esteroideogénesis ovárica, ovulación, formación y conservación del cuerpo lúteo. Todas éstas hormonas llegan a circular a través de pulsos, los mismos que son regulados por el sistema tónico y el sistema cíclico. En donde el sistema tónico es el encargado de producir la cantidad basal de FSH y LH circulantes, éstos estimulan el crecimiento de diferentes componentes, tanto endócrinos como germinales de las glándulas sexuales. Por otro lado, el sistema cíclico tiene como función principal causar la ovulación, éste interviene de forma más aguda, actuando de 12 a 24 horas en cada ciclo. Con respecto a la neurohipófisis se señala que secreta oxitocina la cual interviene en la luteólisis (Bavera, 2005).

Los ovarios también secretan hormonas, tanto endocrinas y exocrinas; las mismas que son los estrógenos, la inhibina y la progesterona. Consiguientemente los estrógenos provienen del folículo ovárico y son los encargados de estimular los signos de celo, ya que, actúa en diferentes órganos como: vulva, vagina, útero y trompas. Además; los ovarios también producen progesterona, la cual, se produce en el cuerpo lúteo por estímulo de la LH; ésta hormona actúa sobre el útero preparándole para la implantación del embrión y conservar la gestación. Finalmente, la inhibina se origina en las células de la granulosa, esta hormona actúa regulando la secreción de la FSH, provocando un Feed back negativo en la adenohipófisis, disminuyendo la secreción de FSH (Palomares, 2009).

### 2.3 Fases del ciclo estral

Las fases del ciclo estral se encuentran divididas en cuatro etapas sucesivas:

**Proestro:** esta es una etapa folicular, la cual es una fase en la que el cuerpo lúteo es retrogrado y se da el crecimiento de un folículo ovulatorio, también hay un incremento de las concentraciones de estrógenos y se da un aumento del endometrio (Schatten y Constantinescu, 2007).

**Estro o celo:** esta es una etapa folicular, aquí se da el desarrollo completo del folículo dominante y finalmente la ovulación. La hembra bovina permite la monta por una compañera de hato o por el macho, el cambio del comportamiento es notorio, esto se

da por el aumento de la concentración del estradiol el cual se da a partir del folículo preovulatorio y considerando que el cuerpo lúteo no está presente en esta fase. Por otro lado, el útero también sufre modificaciones, ya que presenta una turgencia, se observan los labios vulvares edematizados y hay la presencia de moco cervical, el cual tiene que ser cristalino. El estro tiene una duración de 12 a 18 horas. Se debe enfatizar que el inicio de esta fase está relacionado con la segregación ovulatoria de LH, considerando que los estrógenos también intervienen en el pico de LH. Con respecto a la ovulación, ésta ocurre de 30 a 36 horas de haber iniciado el estro (Singh y Jaswant, 2021).

**Metaestro:** esta es una fase lútea, en la cual se inicia la creación de un nuevo cuerpo lúteo funcional y bien establecido. En esta fase la hembra ya no es receptiva a la monta, es decir ya no permite ser montada ni por el macho o por sus compañeras de hato, en esta fase se da una transición entre el pico de estrógenos y el aumento de progesterona. Por otro lado, los niveles de FSH aumentan, ya que el estradiol disminuye, iniciando de esta manera el reclutamiento de la primera honda folicular. También se debe destacar que en esta fase el ovario tiene un cuerpo hemorrágico, considerando que del mismo se formará el cuerpo lúteo (Boeta et al., 2018).

**Diestro:** esta es una fase lútea, en ésta el cuerpo lúteo llega a su completa maduración y hay una gran producción de progesterona, los cuales permiten que el útero se encuentre en un estado óptimo para la fijación del embrión. Con respecto al útero este cambia su morfología al disminuir el tono, adelgazar y se queda sin liquido endometrial (DesCoteaux et al., 2010).

## 2.4 Dinámica folicular

La dinámica folicular se caracteriza por presentar ondas de crecimiento y de atresia folicular durante el ciclo estral. Considerando que, las ondas se encuentran reguladas por una serie de hormonas, de esta manera se puede iniciar explicando que con el aumento de la concentración de la FSH se inicia una onda folicular, tomando en cuenta que las hembras bovinas pueden presentar de dos a tres ondas foliculares, esto se ve afectado por la raza, etapa reproductiva, estrés, balance energético y condición corporal. Aun así, se considera que la mayoría de hembras bovinas

presentan dos ondas foliculares, iniciándose la primera onda folicular a los 3 o 4 días del ciclo estral y la segunda folicular a los 12 y 14 días (Gregg y Singh, 2015).

De esta manera se puede describir a la dinámica como el desarrollo folicular que se da en forma de oleadas. Las mismas que se encuentran precedidas por el aumento de la FSH, que requiere del aumento de las cantidades de estradiol que proviene de los folículos en desarrollo (Zacarias et al., 2015).

Es así que en una oleada folicular se puede observar lo siguiente:

**Reclutamiento:** la cual consiste en alistar un conjunto de folículos que se encuentran en desarrollo, con un tamaño de 3 a 4 mm para ser seleccionados.

**Selección:** esta fase se caracteriza por la selección de un folículo, es decir, cuando un folículo llega a medir 8 mm, el cual crece mucho más rápido, éste continuará su desarrollo y los demás folículos se atresian.

**Dominancia:** el folículo seleccionado alcanza su desarrollo completo e interviene en la inhibición del desarrollo de los folículos de la oleada. Se debe tomar en cuenta que la ovulación del folículo dependerá de la regresión del cuerpo lúteo. Esta fase se caracteriza por la disminución de la hormona FSH y el incremento de LH, por consiguiente, el folículo dominante desarrolla receptores de LH en las células de la granulosa específicamente. Tomando en cuenta que las concentraciones de FSH incrementan cuando la secreción de estradiol disminuye. Desencadenando de esta manera una nueva oleada folicular (Fernández, 2008).

## 2.5 Protocolos de sincronización convencionales

La IATF es una técnica de gran utilidad en las ganaderías bovinas, ya que permite el uso de toros elite, mejorando diferentes rasgos genotípicos y fenotípicos en las siguientes generaciones.

Ésta se basa en el control del ciclo estral bovino a través del uso de dispositivos intravaginales con progesterona, lo cual permite sincronizar la ovulación de animales cíclicos y acíclicos (Yáñez et al., 2018).

En los últimos años se ha desarrollado nuevos protocolos, llamados “tratamientos cortos”, en los cuales han elevado la tasa de preñez, disminuyendo el tiempo de colocación de los dispositivos de progesterona, aumenta el tiempo de dominancia folicular e incrementando el proestro antes de la ovulación.

## 2.6 Protocolos de IATF que alargan el proestro

Hoy en día existen diversos protocolos convencionales o tratamientos que sincronizan el crecimiento folicular y la ovulación del folículo dominante. De esta manera tenemos los dos grandes grupos de protocolos de sincronización los que están basados en estradiol y los que se basan en progesterona. Se debe considerar que el estradiol no está disponible para su uso en el ganado Bovino en algunos países, por lo que se ha desarrollado otros protocolos alternativos (Bó et al., 2019).

De esta manera se menciona a uno de los protocolos más conocidos como es el Ovsynch el cual es a base de GnRH + PGF. En este protocolo se administra en el día 0 GnRH para inducir la liberación de LH, se dé la ovulación y dos días después se dé la emergencia de una nueva onda folicular, en el día 7 se administra PGF, en el día 9 se administra GnRH y en el día 10 se realiza la I.A.

Es así que se a realizado modificaciones al protocolo Ovsynch, ya que este protocolo se ve afectado por la etapa del ciclo estral de la vaca, de esta manera el protocolo Cosynch el cual es similar al Ovsynch con la diferencia que en el segundo tratamiento de GnRH se da junto con la I.A. con la finalidad de disminuir de 4 a 3 días de manipulación de los animales (Olivares y Videa, 2021).

Otro protocolo de sincronización es el Presynch-Ovsynch en el cual se realiza la ampliación de dos dosis de PGF con un intervalo de 14 días y a los 12 días de la segunda aplicación de PGF se inicia con el Ovsynch, todo esto permite que un folículo esté sensible a la liberación de LH y que estará presente en el momento de la primera GnRH

El protocolo doble Ovsynch consiste en dos protocolos Ovsynch seguidos con un intervalo de 7 días uno del otro lo cual permite mejorar la tasa de preñez en vacas primíparas; con este protocolo se aumenta la probabilidad de obtener un folículo

dominante que ovula luego de la tercera dosis de GnRH y una mayor concentración de progesterona circulante antes del segundo Ovsynch (Rubio et al., 2009).

Se debe considerar que la administración de la segunda dosis de GnRH en el protocolo Ovsynch induce la liberación de LH con una duración de 4 a 5 horas que es mucho mas corta que la duración de LH endógena durante el estro natural, por lo que se a investigado otras alternativas para reemplazar el segundo tratamiento de GnRH, como es el uso de pLH o eCG, con esta última permite mejorar la madurez del folículo y aumentar las concentraciones periovulatorias de estradiol (Colazo et al., 2014).

### 2.6.1 Protocolo J-synch

De esta manera se describe a un protocolo de sincronización llamado “J- Synch”, el cual trata en la aplicación de benzoato de estradiol, más un dispositivo de progesterona durante 6 días y no de 7 u 8 días como el resto de protocolos, finalmente se aplica una dosis de GnRH con la finalidad de inducir la ovulación después de 72 horas del retiro del

dispositivo intravaginal (Artagaveytia y Brochado, 2016).

Es así que la etapa de dominancia se reduce y el proestro se alarga, considerando que los embriones son de mejor calidad cuando la dominancia de un folículo es menor a 1,5 días. Por otro lado, el alargamiento del proestro está entrelazado con la producción de estradiol, de esta manera permite el incremento de la fertilidad en la IATF.

Así es que en el día 0 se aplica un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona y 2 mg de benzoato de estradiol; el día 6 se quita el dispositivo intravaginal y se aplica 0,15 mg de D- cloprostenol. El día 9 se administra 0,10 mg de Buserelina y finalmente se realiza la IATF (Gamboa, 2020).

### 2.6.2 Efecto de la eCG en protocolos de IATF

Se debe considerar que la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) tiene una actividad muy similar a la FSH y LH. La administración de esta hormona en las vacas seleccionadas permite un aumento de receptores de FSH y LH en los folículos, lo cual permite un aumento en el tamaño del folículo preovulatorio. Con respecto al desarrollo

embrionario y la conservación de la preñez mejoran sustancialmente, ya que la cantidad de progesterona a nivel del plasma incrementa después de la ovulación.

La administración de eCG en los protocolos de sincronización en búfalos con poca expresión de estro ayuda a incrementar la tasa de ovulación. Si este tratamiento es seguido por IATF, los porcentajes de preñez en búfalos en anestro cíclico o no cíclico se incrementa.

A pesar del uso de eCG en vacas Holstein, no incrementa del diámetro del folículo ovulatorio como sucede en bovinos de carne, pero se debe tomar en cuenta que la cantidad de progesterona sérica en la fase luteal siguiente permite que se forme un cuerpo lúteo más competente, incrementándose la tasa de preñez.



### Capítulo 3: Materiales y métodos

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Materiales físicos

- Mangas de manejo
- Guantes de examinación y ginecológicos
- Ecógrafo (Kaixin RKU-10<sup>®</sup>, China)
- Gel lubricante (*hidroximetilcelulosa*)
- Tubos colectores de sangre
- Centrífuga

##### 3.1.2 Materiales Biológicos

- Cuatro vaquillas de la raza Holstein Friesian
- Muestras sanguíneas (suero sanguíneo)

##### 3.1.3 Materiales químicos, medicamentos y reactivos

- Benzoato de estradiol (EB), (Gonadiol<sup>®</sup>, Zoetis, Argentina)
- Dispositivo intravaginal de progesterona – P<sub>4</sub> (0,6 g, DIB<sup>®</sup>)
- PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Ciclase DL<sup>®</sup>, Zoetis, Argentina)
- Gonadotropina coriónica equina (eCG, Norvormón<sup>®</sup>, Zoetis, México)
- GnRH (Gonadorelina, Gonasyn GDR<sup>®</sup>).
- Kit para medición de LH por quimioluminiscencia MAGLUMI<sup>®</sup> LH (chemiluminescence immunoassay, CLIA) (Ref: 139602002M, (Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd., Nanshan, Shenzhen,518057, China)

#### 3.2 Metodología

##### 3.2.1 Área de estudio

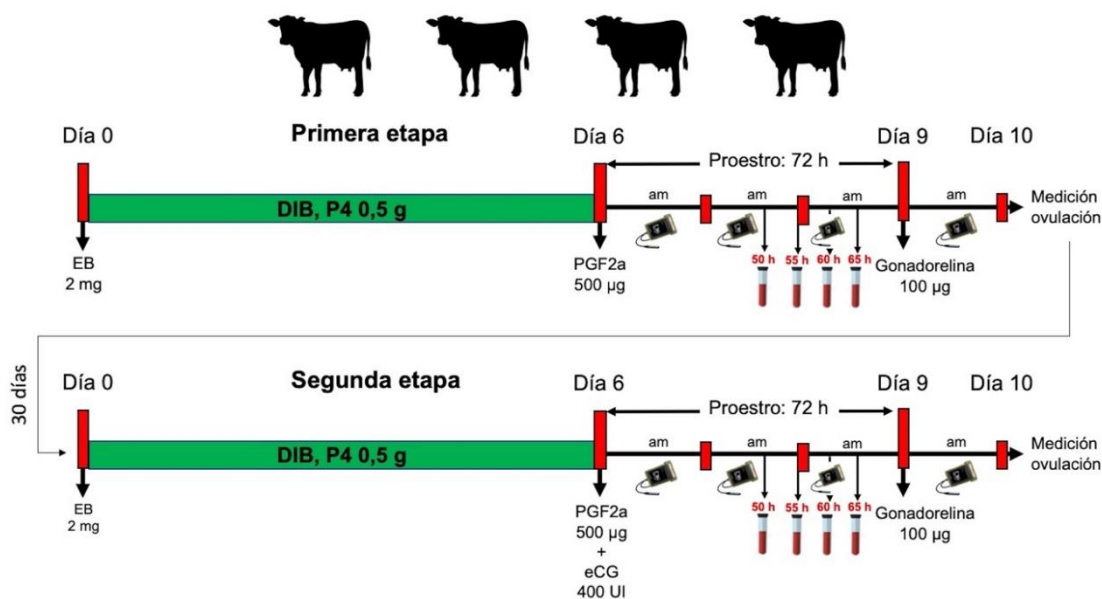
Esta investigación se desarrolló en la Ganadería San Angel, ubicada en la comunidad de Paguancay, parroquia Amaluza, cantón Sevilla de Oro, provincia del Azuay (-2.63289853; -78.6025174). La granja está ubicada a una altura de 2.550 msnm y cuenta con una extensión de 12 hectáreas. Las condiciones climáticas que presenta la propiedad son equivalentes al trópico alto y se caracterizan por un clima templado

con una precipitación anual de 452,7 mm y una temperatura entre 9,4 y 17,0 °C. La topografía dentro del área de investigación es irregular.

### 3.2.2 Diseño experimental

En esta investigación se utilizaron cuatro vaquillas de la raza Holstein Friesian de 16 a 20 meses, clínicamente sanas y con salud uterina y ovárica, y cíclicas según ultrasonografía. En una primera etapa, las vacas fueron sometidas a un protocolo de IATF llamado J-synch que consistió en: día 0, aplicación de 2 mg de benzoato de estradiol e inserción de un dispositivo intravaginal de progesterona (DIV-P<sub>4</sub>) de 0,5 g; día 6, retiro del DIV-P<sub>4</sub> y aplicación de PGF2 $\alpha$ . A partir de entonces, se hicieron evaluaciones ecográficas diarias hasta el día 10 para monitorear cambios foliculares. A las 50, 55, 60 y 65 horas de la luteólisis inducida se retiró tomó muestras sanguíneas para el análisis de LH. Al Día 9 del protocolo se aplicó 100  $\mu$ g de GnRH y al día 10 se verificó la ovulación.

En una segunda etapa, luego de un descanso de 30 días de haber finalizado el primer protocolo, las vacas fueron sometidas al mismo protocolo J-synch, con la adición de 400 UI de eCG al día 6 después de retirar el DIV-P<sub>4</sub> y de aplicar PGF2 $\alpha$ . Las ecografías y toma de muestras sanguíneas fueron realizadas en las mismas condiciones de tiempo detalladas en el protocolo de la primera etapa. El Diseño experimental se muestra en la Figura 2.



**Figura 1** Diseño experimental. Fuente: Los autores

### 3.2.3 Animales

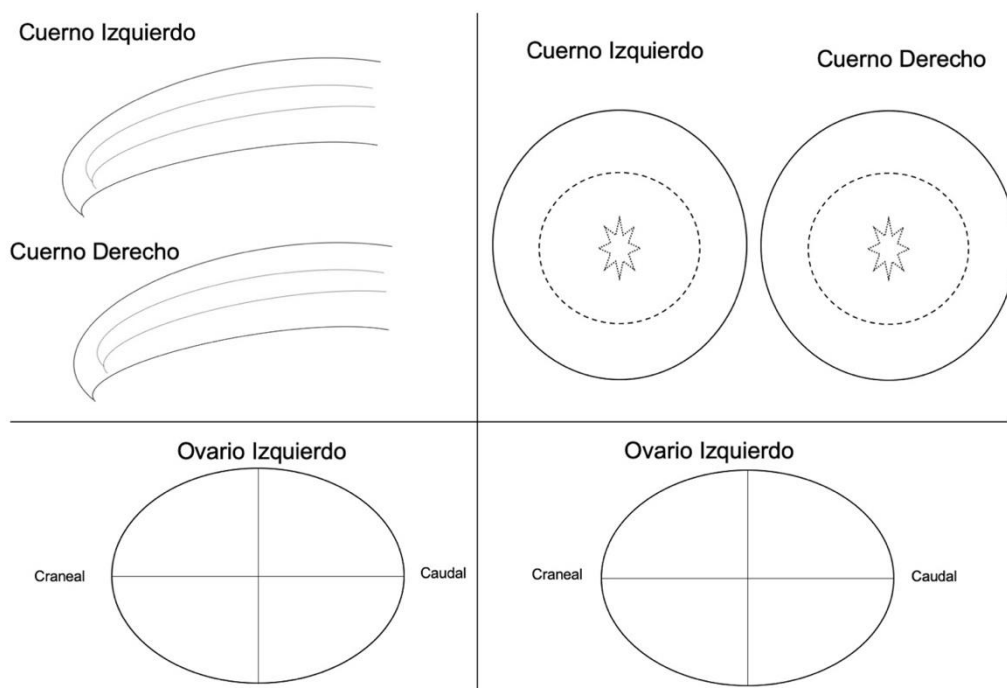
Las vaquillas tuvieron un peso entre 320 a 350 Kg y una CC entre 2,5 y 2,75 (según la escala de puntuación del 1 al 5). Todas las vaquillas contaban con vacunas vigentes que previenen las siguientes enfermedades: víricas reproductivas, brucelosis, clostridiales y fiebre aftosa. La dieta basal se basó principalmente en el consumo de pasto (*Ryegrass, kikuyo, trébol, llantén forrajero*), 2 kg/vaca/día de concentrado NUTRAVAN® 12-24, y 150 g/vaca/día sales minerales PECUTRIN®. El consumo de agua fue *Ad libitum*. El pastoreo de las vacas fue rotacional cada 2 días mantenidas en potreros con cercado eléctrico.

### 3.2.4 Metodología de la investigación

#### 3.2.4.1 Protocolo de IATF

Las cuatro vaquillas seleccionadas para esta investigación fueron inicialmente evaluadas ginecológicamente mediante ultrasonografía usando una sonda lineal adaptado a una frecuencia de 7,5 MHz y una profundidad máxima de 10 cm. Para determinar la salud uterina se realizó la ecografía de barrido registrando el útero (cérvix, cuerpo y cuernos) y ovarios (Figura 3). Cada ovario fue analizado mediante un barrido cráneo-caudal dorsal y lateral izquierdo y derecho. En una ficha, se

registraron los datos ecográficos de cada estructura. Los folículos y cuerpos lúteos en cada ovario fueron registrados en número y tamaño (X y Y, largo y ancho [mm], respectivamente) (Figura 3). Esta evaluación inicial sirvió para determinar el estado de salud uterina, y una aproximación de la etapa del ciclo estral en que se encontraban las vaquillas



**Figura 2** Plantilla para el registro de hallazgos ecográficos en el tracto uterino y ovárico de las vaquillas. Fuente: Los autores

Esta investigación constó de dos etapas separadas durante 30 días después de culminar el primer protocolo. La primera fase consistió en aplicar un protocolo 'J-synch' (J-Synch) que consistió en (ver etapa 1 de Figura 2):

- Día 0= 2 mg Benzoato de Estradiol + DIV-P<sub>4</sub> (0,5 g)
- Día 6= Remoción del DIV-P<sub>4</sub> + 500 µg PGF<sub>2</sub>α. Ecografía (am).
- Día 7= Evaluación ecográfica (am).
- Día 8= Evaluación ecográfica (am). Recolección de muestras de sangre a las 50, 55, 60 y 65 h luego de la aplicación de PGF<sub>2</sub>α (del Día 6)
- Día 9= 100 µg de acetato de gonadorelina, evaluación ecográfica (08h00). Detección de celo

- Día 10= Evaluación ecográfica (am) para verificación de ovulación

Luego de 30 días de haber culminado la primera etapa, se inició con la etapa 2, que consistió en un protocolo J-synch que incluye una dosis de eCG (J-Synch + eCG) al inicio del proestro en el Día 6 (Figura 5):

- Día 0= 2 mg Benzoato de estradiol + DIV-P<sub>4</sub> (0,5 g)
- Día 6= Remoción del DIV-P<sub>4</sub> + 500 µg PGF<sub>2</sub>α. Ecografía (am) + 400 UI de eCG
- Día 7= Evaluación ecográfica (am).
- Día 8= Evaluación ecográfica (am). Recolección de muestras de sangre a las 50, 55, 60 y 65 h luego de la aplicación de PGF<sub>2</sub>α (del Día 6)
- Día 9= 100 µg de acetato de gonadorelina, evaluación ecográfica (08h00). Detección de celo
- Día 10= Evaluación ecográfica para verificación de ovulación

#### 3.2.4.2 Análisis ecográfico

La ecografía se realizó a partir del día 6 se registraron las diferentes estructuras ováricas y se midió el tamaño del folículo seleccionado y/o desviado y/o dominante. El registro ecográfico se realizó cada mañana de los días 6 al 10 de ambos protocolos de sincronización Durante los días 9 y 10 se determinó el celo de las vaquillas usando un parche detector de estro, y, además, se determinó la ovulación por ultrasonografía. La ovulación se determinó verificando la morfometría y ecogenicidad del folículo ovulatorio en transición a un cuerpo hemorrágico (CH). El cambio de forma redonda (folículo ovulatorio) a forma irregular (ovalada y/o bordes ligeramente rugosos), y el cambio de ecogenicidad (de anecoico a ecoico) sirvió de base para determinar la ovulación y indicando la formación de un cuerpo hemorrágico luteal.

#### 3.2.4.3 Análisis de LH

En cada vaquilla y en cada protocolo (J-synch y J-synch + eCG) y 2 se tomó una muestra sanguínea en un tubo de tapa roja a las 50, 55, 60 y 65 horas, después de haber removido el DIV-P<sub>4</sub> y aplicado la PGF<sub>2</sub>α. Con esta actividad se evaluó la titulación de LH en sangre. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos y el suero sanguíneo fue colocado en un tubo Khan estéril, el cual fue rotulado

y almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. EL análisis de titulación de LH se realizó en un laboratorio particular mediante un inmunoensayo de quimioluminiscencia (ensayo inmunoluminométrico tipo sándwich) usando el KIT MAGLUMI® LH (CLIA). Este ensayo consistió en usar un anticuerpo monoclonal anti-LH para marcar 'N-etiisoluminol (ABEI)' y otro anticuerpo monoclonal para cubrir las microesferas magnéticas. Cada muestra sérica de cada vaca fue marcada con ABEI y mezcladas con las microesferas magnéticas e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , (formando un sándwich). A esta mezcla se agregaron los reactivos del KIT y se produjo una reacción quimioluminiscente instantánea. La señal luminosa se midió mediante un fotomultiplicador como RLU en 3 segundos y que fue proporcional a la concentración de LH presente en las muestras sérica.

### 3.2.5 Análisis estadístico

Los datos recogidos en campo (tamaño folículos ovulatorios, ovulación y cuerpos lúteos) y del laboratorio (concentración de LH) fueron tabulados en Excel, y analizados estadísticamente en el software STATISTICA (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA), *versión 12.0*. Los datos fueron expresados en media  $\pm$  EEM (error estándar de la media) por cada vaquilla y del promedio de las 4. Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística Shapiro Wilk para determinar la normalidad; las variables que no cumplieron su distribución normal fueron transformadas a *Log-10* previo a los análisis estadísticos. El efecto de la eCG administrada al inicio del proestro inducido sobre la concentración de LH y respuesta folicular fue contrastada con su contraparte control usando la prueba *t-Student*. Para evaluar la tasa de ovulación ocurrida entre los días 8 y 10 de los protocolos de sincronización en estudio, se usó una prueba de *Chi-cuadrado*.

## Capítulo 4: Resultados

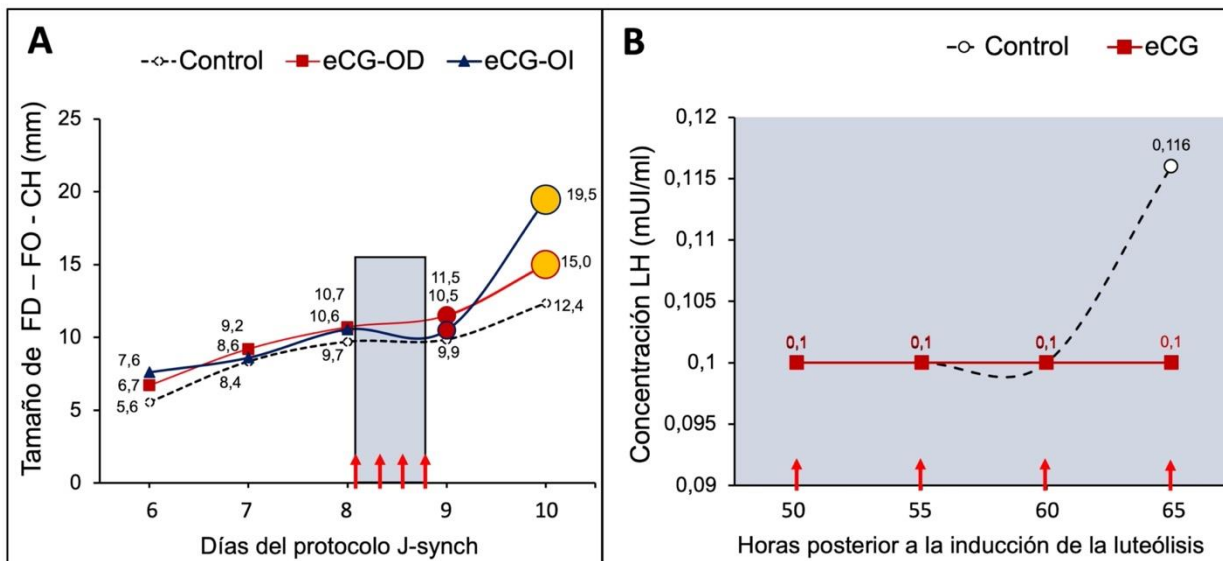
### 4.1. Evaluación ecográfica de estructuras ováricas y concentración de LH

La evaluación del tamaño de los folículos dominantes (FDs), folículo ovulatorio (FO), ovulación (Ov) y cuerpo hemorrágico (CH) equivalente a la formación de tejido luteal de las 4 vaquillas Holstein Friesian sometidas a los protocolos de J-synch y J-synch + eCG se muestran en las figuras 4 – 7.

#### 4.1.1. Vaquilla 1

La evaluación ecográfica del FD en el día 6 (inducción a la luteólisis) en el protocolo J-Synch demostró que la vaquilla 1 no respondió al tratamiento hormonal debido a que no ovuló ni presentó formación de tejido luteal hasta el final del protocolo (día 10). Sin embargo, al aplicar el protocolo J-synch + eCG, esta vaquilla presentó un FD en el ovario izquierdo y otro en el derecho (codominancia), que en la mañana del día 9 midieron 10,5 y 11,5 mm, respectivamente. La ovulación ocurrió poco después porque en la mañana del día 10 los FDs habían desaparecido, y en su lugar se observaron en el ovario izquierdo y derecho dos CH de 19,5 y 15,0 mm, respectivamente (Figura 4-A).

En el protocolo J-synch (sin eCG) se observó un ligero incremento en la concentración de LH a las 65 h; por esta razón, la vaca no presentó ovulación ni presentó cuerpo hemorrágico durante los días registrados del protocolo. No obstante, al aplicar el protocolo con J-synch + eCG, esta vaquilla no registró un incremento de LH; lo que sugiere que la vaca debió aumentar la pulsatilidad de esta hormona antes de las 50 h del retiro del DIV-P<sub>4</sub> (Fig 4-B).



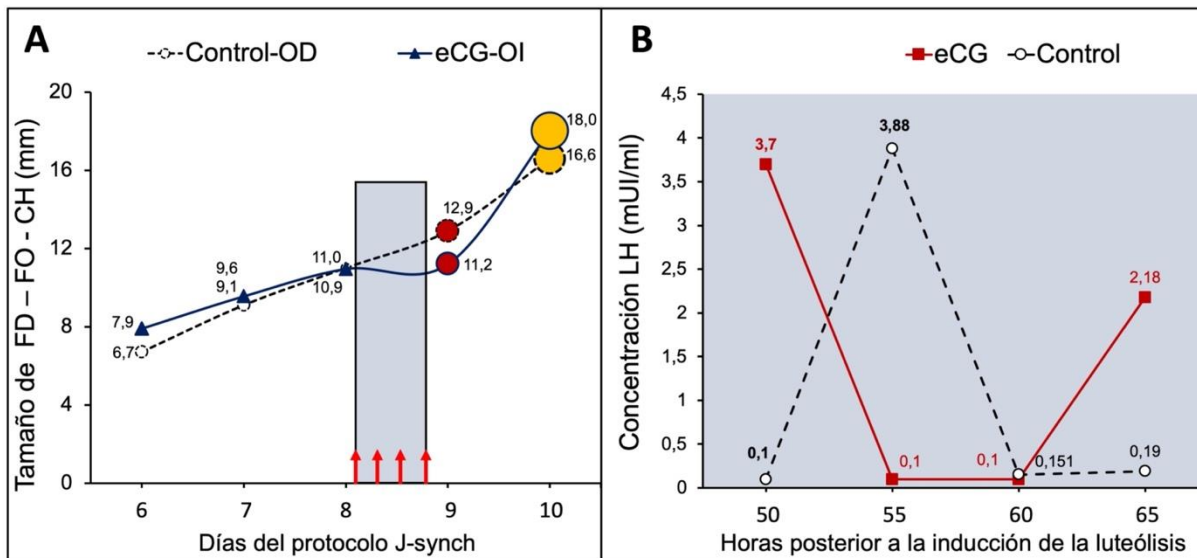
**Figura 3** Evaluación ecográfica del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO, ●), cuerpo hemorrágico (CH, ●) y concentración de la hormona LH en los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG en la vaquilla 1.

#### 4.1.2. Vaquilla 2

La vaquilla 2 respondió al protocolo J-synch registrando un FD en el ovario derecho de 10,9 mm en el día 8, un FO de 12,9 mm en el día 9, y un CH de 16,0 mm en el día 10. Por otro lado, con la aplicación del protocolo J-Synch + eCG se observó un FD de 11,0 mm en el ovario izquierdo al día 8, un FO de 11,2 mm al día 9 y un CH más grande de 18,0 mm en la mañana de día 10. La ovulaciones ocurrieron en algún momento de la tarde del día 9 y la mañana del día 10, porque en la mañana del día 10 ya se registraron CHs en los ovarios derecho (protocolo J-synch) y izquierdo (J-synch + eCG), respectivamente (Fig. 5.A).

El análisis de la concentración de LH registró un pico máximo a las 55 h (3,88 mUI/ml) y las 50 h (3,70 mUI/ml) en los protocolos J-synch y J-synch + eCG, respectivamente, después de la inducción de la luteólisis (Fig. 5-B). Por lo tanto, estos resultados sugieren que los incrementos de LH sérica en ambos protocolos fueron determinantes para que la ovulación ocurriera en algún momento del día 9





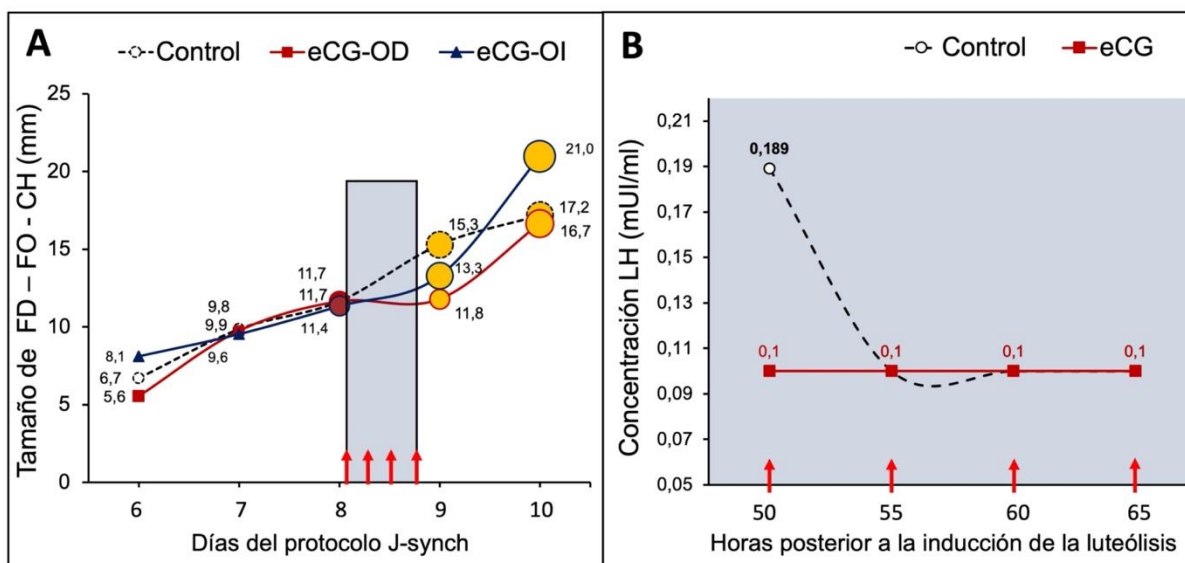
**Figura 4** Evaluación ecográfica del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO, ●), cuerpo hemorrágico (CH, ●), y concentración de la hormona LH en los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG en la vaquilla 2

4.1.3. Vaquilla 3

Como resultado de aplicar el protocolo J-synch (control) en la vaquilla 3 se observó un FO de 11,7 mm en el día 8, y CHs de 15,3 y 17,2 mm en el día 9 y 10 respectivamente. Sin embargo, el protocolo J-synch + eCG produjo codominancia folicular presentando FOs de 11,7 y 11,4 mm al Día 8, y CHs de 11,8 y 13,3 mm al día 9 y de 21,0 y 16,7 mm al día 10, en el ovario izquierdo y derecho, respectivamente. Las ovulaciones en ambos protocolos, ocurrieron en algún momento posterior a la mañana de día 8 y porque en la mañana del día 9 ya presentaron cuerpos hemorrágicos (Fig. 6-A).

El protocolo J-synch registró una concentración de LH de 0,189 mUI/ml a las 50 h luego de inducida la luteólisis, que viene, probablemente, de un descenso de pulsaciones. No obstante, la concentración de LH luego de aplicar el protocolo con J-synch + eCG no evidenció un incremento durante las horas de medición. Estos resultados sugieren que en ambos protocolos J-synch (con y sin eCG) aplicados a la vaquilla 3, el pico de LH, probablemente, ocurrió antes de las 55 horas posterior a la inducción de la luteólisis debido a que la ovulación en ambos casos ocurrieron en

algún momento pasado la mañana del día 8 porque en la mañana del día 9 ya existieron tejidos luteales en formación (Fig. 6-B).



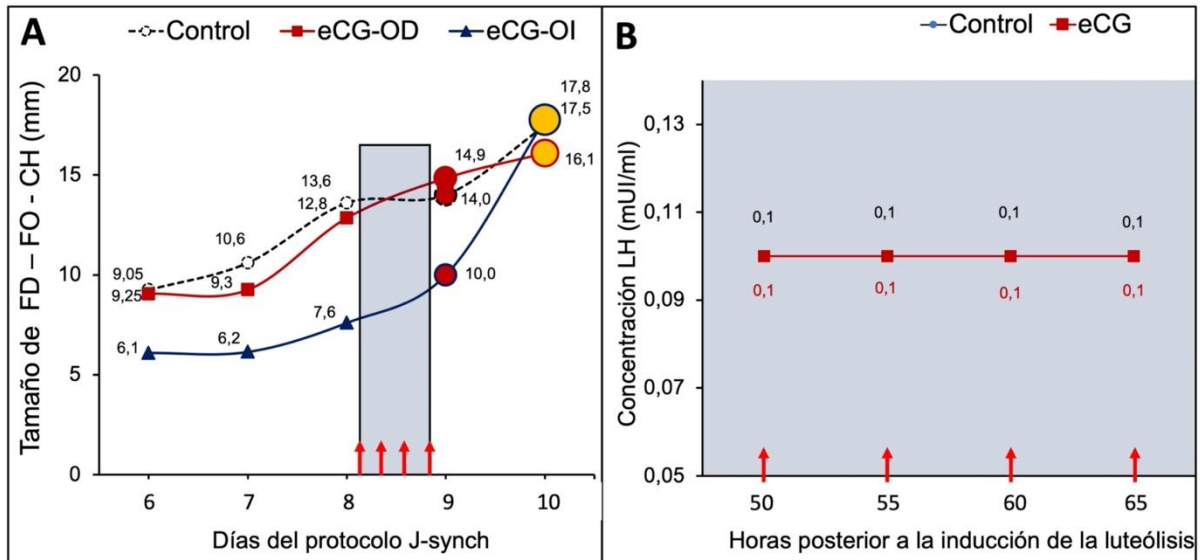
**Figura 5** Evaluación ecográfica del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO, ●), cuerpo hemorrágico (CH, ●), y concentración de la hormona LH en los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG en la vaquilla 3

4.1.4. Vaquilla 4

La aplicación del J-synch con y sin eCG en la vaquilla 4 produjo la sincronización del celo y la ovulación. Como resultado del protocolo J-Synch se produjo un FD de 13,6 mm al día 8, un FO de 14 mm, y un CH de 17,5 mm al día 10 en el ovario derecho. Sin embargo, la aplicación del protocolo J-synch + eCG produjo inicialmente un FD de 12,8 mm al día 8 en el ovario derecho, sin embargo, al día 9 presentó codominancia de dos FOs de 14,9 y 10 mm y CHs de 17,8 y 16,1 mm al día 10 en el ovario derecho e izquierdo, respectivamente. La ovulación, en ambos protocolos, ocurrió alrededor del Día 9 porque en la mañana del día 10 ya observó la formación de tejido luteal (Fig. 7-A).

La concentración de LH luego de aplicar ambos protocolos J-synch (con y sin eCG) no evidenció incremento de LH durante el período de medición (Fig. 7-B). Como ocurrió en las vaquillas 1 y 3, estos resultados sugieren que en ambos protocolos aplicados a la vaquilla 4, el incremento máximo de LH pudo haber ocurrido antes de

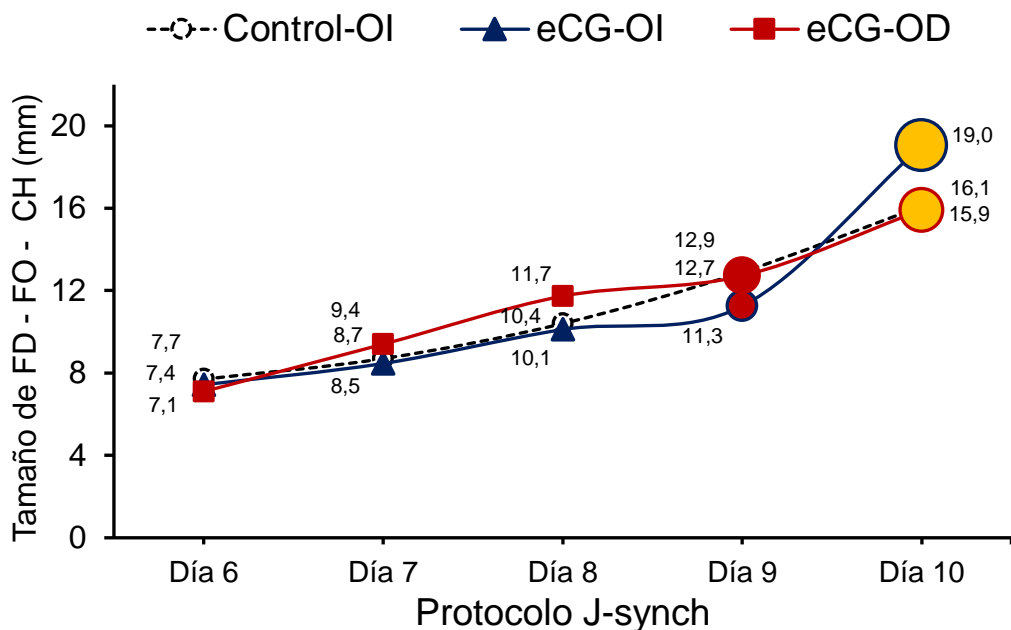
las 50 – 55 horas posterior a la inducción de la luteólisis, debido a que la ovulación en ambos casos ocurrió en algún momento del día 9.



**Figura 6** Evaluación ecográfica del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO, ●), cuerpo hemorrágico (CH, ●), y concentración de la hormona LH en los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG en la vaquilla 4

4.1.5. Valores promedios de folículos ovulatorios y cuerpos hemorrágicos.

El protocolo J-synch produjo un FO promedio de 12,9 mm de diámetro en el día 9 y CH promedio de 16,1 mm al día 10. Por otro lado, el protocolo J-synch + eCG produjo codominancia de dos FOs de 11,3 y 12,7 mm de diámetro promedio en el día 9 y CHs de 15,9 y 19,0 mm promedio en el ovario derecho e izquierdo, respectivamente (Fig. 8)



**Figura 7** Valores promedios del folículo dominante (FD), folículo ovulatorio (FO, ●), cuerpo hemorrágico (CH, ●), de las 4 vaquillas evaluadas ecográficamente durante la aplicación de los protocolos J-synch (control) y J-synch + eCG

No existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) del tamaño de FD, FO, Ovulación y CH entre tratamientos J-synch y J-synch + eCG en las vaquillas Holstein Friesian. Por lo tanto, la adición de eCG no produjo un efecto significativo sobre la tasa de ovulación, no obstante, la aplicación de 400 UI de eCG fue suficiente para producir codominancia en estas vaquillas presentando un segundo FD en los ovarios contrapuestos. De hecho, la adición de eCG al protocolo J-synch concentró el 75% de las ovulaciones en el día 9, mientras que en el control hubo mayor dispersión de la ovulación. Los valores promedios de ambos tratamientos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1** Tamaño de folículos, tasa de ovulación y tamaño del CH en cuatro vaquillas sometidas al protocolo de sincronización de estro J-Synch con y sin eCG.

Día del tratamiento	Tratamientos*	
	J-synch (control) (n = 4)	J-synch + eCG (n = 4)
<i>Diámetro del Folículo Dominante / Ovulatorio (mm)</i>		
Día 6	7,2 ± 1,39	7,3 ± 1,23
Día 7	9,3 ± 0,91	8,9 ± 1,25
Día 8	11,3 ± 1,49	10,8 ± 1,61
Día 9**	12,3 ± 0,50	11,5 ± 0,93
<i>Tasa de Ovulación (%)</i>		
Día 8 (48 h)	25% (1/4)	25% (1/4)
Día 9 (72 h)	50 % (2/4)	75% (3/4)
Sin ovulación	25 (1/4)	---
<i>Diámetro del Cuerpo hemorrágico (mm)</i>		
Día 9	13,0 ± 2,01	11,9 ± 1,68
Día 10	15,9 ± 2,07	17,7 ± 2,03

\*Sin diferencias estadísticas, según la prueba t-student ( $P > 0,05$ ). \*\* Valores promedios de las vaquillas 1, 2 y 4 que presentaron un FO al día 9,

### Capítulo 5: Discusión

Los resultados de la presente investigación demostraron que, únicamente en la vaquilla 2, la aplicación del protocolo J-synch con o sin la adición de 400 UI de eCG en el día 6 del protocolo produjo un aumento máximo de LH entre las 50 y 55 h luego retiro del DIV-P<sub>4</sub> o de la luteólisis inducida. Además, en esta misma vaquilla 2 se produjo una ovulación del FO en algún momento del día 9 (72 h) de ambos protocolos J-synch produciendo un cuerpo hemorrágico más grande (19 mm) que su contraparte control (16,6 mm) en la mañana del día 10. En las vaquillas 1, 3 y 4, sin embargo, la adición de 400 UI de eCG en el día 6 del protocolo J-synch fue suficiente para provocar codominancia de folículos y, en efecto, ovulación doble. Además, en estas vaquillas (1, 3 y 4) no se registró aumentos de la concentración de los niveles séricos de LH entre las 50 y 65 h posterior a la inducción de la luteólisis, lo que sugiere que este aumento ocurrió antes de las 50 h, dado que, según el registro ecográfico, la ovulación ocurrió entre los días 8 y 9 del protocolo.

En la presente investigación, la respuesta folicular y ovulatoria del protocolo J-synch (control) desempeñó un rol diferente en las 4 vaquillas. En la primera vaquilla, el FD de la onda sincronizada fue > 10 mm de diámetro alrededor del día 8 y 9, y no se registró una ovulación hasta el día 10 del protocolo, cuando se observó un cuerpo hemorrágico y ausencia de una estructura folicular. En las vaquillas 2 y 4, el protocolo J-synch sincronizó la onda folicular, y la ovulación se produjo en el día 9 del protocolo. A diferencia de las dos vaquillas anteriores, en la vaquilla 3 la ovulación se adelantó al día 8. De todas maneras, al día 10 del protocolo, estas vacas mostraron un cuerpo hemorrágico entre 16 a 17 mm.

Por otro lado, la aplicación de eCG en el día 6 del protocolo J-synch no mejoró la respuesta hormonal ni folicular, no obstante, los 400 UI de eCG provocaron la ovulación doble (indeseable) en el 75% de los animales. La codominancia folicular y la subsiguiente ovulación doble produce mellizos dicigóticos que puede producir complicaciones reproductivas, sanitarias y económicas en aquellas vacas o vaquillas durante la gestación, parto y el puerperio (López et al., 2005). Si bien, la vaquilla con mellizos dicigóticos podría terminar su preñez, estas podrían sufrir trastornos tales

como distocia, y retención membranas fetales, hipocalcemia, cetosis placentaria (Joosten y Hensen, 1992), metritis puerperal, endometritis, mastitis, provocando incluso el descarte (Kinsel et al., 1998; Smith y Risco, 2002). Además, cuando existen gestaciones heterosexuales, pueden dar origen a hembras con Freemartinismo (infértiles) (Gregory et al., 1996). Por estas razones, la codominancia folicular y ovulación doble constituyen una práctica indeseable en la ganadería lechera.

Los folículos subordinados pueden alcanzar la dominancia si se elimina el FD original o si se suministra FSH exógena (Adams et al., 1993). De manera similar, la codominancia (más de un FD en una onda folicular) se asocia con un perfil folicular de diámetro más pequeño, lo que sugiere competencia sobre la disponibilidad limitada de LH. Las ovulaciones dobles resultan de la codominancia folicular durante la onda ovulatoria. Estudios previos han demostrado que la incidencia de “codominancia” fue baja o nula en estudios de vaquillas no lactantes (Quirk et al., 1986; Ko et al., 1991; Sartori et al., 2004), no obstante, en vacas lecheras lactantes, la codominancia osciló entre el 21 y el 36 % (Fricke y Wiltbank, 1999). Una alta incidencia (10–39 %) de ovulaciones múltiples en vacas lecheras de alta producción se ha descrito en varios estudios (López et al., 2005). En vacas que ovularon múltiples folículos, todos los folículos ovulatorios surgieron de la misma onda folicular (Sartori et al., 2004). En vacas que desarrollaron múltiples folículos dominantes, el proceso de desviación se asoció con concentraciones circulantes más bajas de inhibina y progesterona en comparación con vacas que desarrollaron un solo folículo dominante (López et al., 2005). Estos efectos son consistentes con concentraciones circulantes más altas de FSH y LH en el momento esperado de desviación, crecimiento continuo del segundo y tercer folículo más grande de la onda folicular, y desarrollo de múltiples FDs. Esto explica por qué el uso de una dosis alta de 400 UI de eCG en vaquillas lecheras fue suficiente para promover el crecimiento de folículos de mayor talla para convertirse en FDs. Una vez que se indujo la luteólisis, los niveles de P<sub>4</sub> sérica disminuye, en a la vez esto provocó un aumento en la frecuencia de pulsos de estradiol a nivel folicular para producir una retroalimentación positiva al eje hipotalámico e hipofisiario aumentando la frecuencia de pulsos de la hormona LH y ejerciendo su acción a nivel folicular y, en consecuencia, la ovulación (simple o doble) fue producida.

La dosis entre 400 a 500 UI de eCG ha sido previamente usada en vacas y vaquillas *Bos taurus*, *Bos indicus* y sus cruces sin afectar la ovulación (Núñez-Olivera et al., 2014; Yáñez-Avalos et al., 2018, 2021), sin embargo, Portillo et al. (2015) determinó que el uso de 400 UI de eCG en protocolos de IATF en vaquillas cebuinas provocó más de una ovulación, por consiguiente, los autores sugirieron que una dosis de 200 UI de eCG en vaquillas es suficientes para mejorar el desarrollo del folículo ovulatorio sin afectar la ovulación.

Estos resultados sugieren que el protocolo J-synch aplicado en vaquillas Holstein Friesian criadas en el trópico alto ecuatoriano no es el más idóneo (aconsejable) debido a la heterogeneidad de los animales y su respuesta folicular. Un trabajo realizado vacas *Pardo Suizo x Bos indicus* criados en condiciones tropicales de la Amazonía Ecuatoriana determinaron que el desarrollo folicular y la fertilidad fue similar entre protocolos J-synch + 500 UI eCG inseminadas a las 60 o 72 h (proestro prolongado) (Yáñez-Avalos et al., 2018). Más tarde, en una segunda investigación, los mismos autores demostraron que el protocolo J-Synch + 400UI de eCG aplicado al Día 6 del protocolo (luteólisis) produjo un diferente comportamiento en el desarrollo folicular y en el tamaño del CL a las 60 h y 72 h en vaquillas Brown Swiss y sus cruces *Bos indicus* criadas en la Amazonía Ecuatoriana (Yáñez-Ávalos et al., 2021). Los autores demostraron que la ovulación fue mayor con el protocolo J- Synch + eCG (n=24 vaquillas =  $94,5 \pm 0.9$  %), comparado con el grupo J-Synch sin eCG (n= 18 vaquillas:  $88,0 \pm 1.1$  %). Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que, a pesar de ser un número reducido, el porcentaje de ovulación fue mayor a las 72 h (75%) con el protocolo J-synch + eCG comparado con el control sin eCG (50%). No obstante, en 3 de 4 vaquillas las ovulaciones fueron dobles con eCG. Sin duda, el efecto racial (*Bos taurus* y *Bos indicus*) y el sistema de manejo (trópico alto y bajo) sobresalen en estos dos estudios. Asimismo, Nuñez-Olivera et al. (2014) compararon dos protocolos de IATF de proestro prolongado, uno con 400 UI eCG y otro sin eCG (control). Estos autores obtuvieron un diámetro folicular de  $8,8 \pm 0,4$  mm y  $12,3 \pm 0,5$  mm a las 48 h y 72 h respectivamente, con el protocolo con eCG; mientras que con el grupo control obtuvieron un FD de  $8,2 \pm 0,3$  mm y a 72 h de  $13,5 \pm 0,3$  mm, sin encontrar diferencias significativas. Nuestros resultados son consistentes con los



resultaos obtenidos por Núñez-Olivera et al. (2014) en cuanto al tamaño folicular tanto a las 48 como a las 72 horas posterior a la inducción de la luteólisis

La eCG posee una vida media de acción sea más larga (2 días) en bovinos (Menzer y Shams, 1979; Tortorella, 2013) debido a que su molécula contiene oligosacáridos altamente sialilados (Damm et al. 1990) que reducen el metabolismo y la filtración de eCG en el hígado y los riñones, respectivamente (Martinuk et al., 1991). Por lo tanto, después de la administración de altas dosis de eCG (por ejemplo, > 800 – 1000 UI), la concentración activa de eCG en el torrente sanguíneo puede alcanzar hasta por 118 a 123 h en ganado bovino (Cole et al., 1967; Menzer y Shams, 1979). En este sentido, se ha identificado que las altas concentraciones de eCG (>500 – 1500 UI) en protocolos de sincronización de celo y ovulación, es suficiente para causar una ovulación múltiple de folículos dominantes (Rensis y López-Gatius, 2014). Luego de la luteólisis (concentración baja de progesterona), la concentración de GnRH sérica aumenta durante el proestro; esto provoca que la eCG influya en el crecimiento de los FDs y su posterior incremento de estradiol intrafolicular para lograr un aumento de la frecuencia de pulsos de LH favoreciendo la dominancia múltiple y, eventualmente, a la ovulación de más de un folículo (Hernández, 2012).

Portillo et al. (2015) sugieren que una dosis de 200 UI de eCG es necesario para que se de un adecuado crecimiento folicular, considerando que no provocaría la ovulación doble en vaquillas mestizas *cebuinas* sincronizadas con un progestágeno intravaginal. Por otro lado, la dosis de 400 UI de eCG influyó en la codominancia folicular provocado más de una ovulación; que a su vez provocó mayor cantidad de cuerpos lúteos y mayor secreción de progesterona. Nosotros creemos que la dosis de 400 UI de eCG en las tres vaquillas Holstein Friesian fue determinante para provocar ovulación doble. De hecho, Souza et al. (2006) determinaron que la aplicación de 400 UI de eCG después de remover el DIV-P<sub>4</sub> en un protocolo de IATF, provocó una doble ovulación (12 – 21 %) en vacas Holstein Friesian lactantes. Por lo tanto, el uso de dosis menores (Ej. 200 UI de eCG) podría inducir un adecuado crecimiento folicular sin estimular la ovulación de más de un folículo (o la ovulación doble) como ha sido previamente demostrado por Portillo-Martínez et al. (2015) y Bravo-Ferrín (2021).

La ovulación tiene una relación con el pico de LH y ocurre entre las 28 y 30 h posterior a su incremento máximo (Olivares y Videa, 2021). Existe una alta variabilidad en el momento del pico de LH y la ovulación en las vaquillas, no obstante, los porcentajes de fertilidad no han mostrado diferencias significativas (Colazo y Mapletof, 2014). Por otro lado, se ha determinado que el momento del pico de LH después de la eliminación de un dispositivo vaginal de P<sub>4</sub> no está influenciado por la adición de eCG, el tratamiento de inducción a la ovulación (GnRH o ECP) o su interacción (Souza et al., 2009). En promedio, en vacas lecheras lactantes de alta producción, el pico de LH y la ovulación ocurren a las  $43,6 \pm 1,5$  h y  $67,5 \pm 2,4$  h después de la remoción de dispositivo de P<sub>4</sub> (Souza et al., 2009). Otros autores sugieren que el pico de LH ocurre entre 54 y 96 h (promedio:  $68,0 \pm 4,7$  h) a partir de la eliminación de la fuente exógena de P<sub>4</sub> y/o inducción de la luteólisis dentro de un protocolo de IATF (Colazo, 2003). En el presente estudio, se hipotetizó que el pico de LH en respuesta al protocolo J-synch ocurriría entre las 50 y 65 h después de la remoción de la P<sub>4</sub>. Sin embargo, solo en una vaquilla (No. 2) el pico de LH tuvo lugar entre las 50 y 55 h, independientemente de la adición o no de eCG al protocolo J-synch. Nosotros creemos que la ovulación en las otras vaquillas ocurrió antes de las 50 h debido a que la ovulación se presentó en un rango de tiempo entre las 48 h (Día 8) y 72 h (Día 9) del proestro.

## Conclusiones

Esta investigación concluye que la adición de 400 UI de eCG al día 6 del protocolo J-synch produjo codominancia folicular y ovulaciones dobles en 3 de 4 vaquillas Holstein Friesian criados en el trópico alto ecuatoriano. Además, solamente una vaquilla (No. 2) tuvo la máxima concentración de LH a las 50 o 55 horas después de inducción de la luteólisis, independientemente de la adición o no de eCG.

## Recomendaciones

- Se recomienda hacer más estudios en vaquillas Holstein adicionado una dosis menor de eCG (por ejemplo, 200 UI) con la finalidad de evitar la codominancia folicular y las ovulaciones dobles, lo cual es muy desfavorable en vacas de leche.
- Replicar este estudio en un número más alto de vacas para evaluar el efecto de adicionar eCG a un protocolo J-Synch
- Se recomienda hacer la evaluación de las concentraciones de LH antes de las 55 horas del proestro inducido.

## Referencias

- Adams, G., Kot, K., Smith, C., y Ginther, O. (1993). Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Canadian Journal of Animal Science*, 73(2), 267-275 <https://cdnsiencepub.com/doi/pdf/10.4141/cjas93-029>
- Alvarenga, M., Ozanam, P., y Rámires, N. (2016). Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 521-530. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>
- Artagaveytia, R. (2016). Tratamiento corto de 6 días (J-synch) para IATF en vaquillonas de carne: efecto sobre el folículo ovulatorio y el cuerpo lúteo. [thesis, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República Uruguay]. Repositorio Institucional <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10321/1/FV-32521.pdf>
- Astiz, S., y Fargas, O. (2013). Pregnancy per AI differences between primiparous and multiparous high-yield dairy cows after using double Ovsynch or G6G synchronization protocols. *Theriogenology*. doi:doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.026
- Barbieri, A. (2018). Ovarian function, steroid hormones and fertility in cows stimulated with gonadotropins. Piracicaba. [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-02052018-182855/publico/Alexandre\\_Barbieri\\_Prata\\_versao\\_revisada.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-02052018-182855/publico/Alexandre_Barbieri_Prata_versao_revisada.pdf)
- Barros, C., Moreira, M., Figueiredo, R., Teixeira, A., y Trinca, L. (2000). Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 $\alpha$  and estradiol benzoate. *Theriogenology*, 53(5), 1121-1134. doi:10.1016/S0093-691X(00)00257-0

- Bavera, G. (2005). *Fisiología reproductiva del bovino*. Produccion animal Argentina. [https://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/71-fisiologia\\_reproductiva\\_del\\_bovino.pdf](https://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/71-fisiologia_reproductiva_del_bovino.pdf)
- Becaluba, F. (2006). *Métodos de sincronizacion de celos en bovinos*. Sitio argentino de produccion animal. [https://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/92-metodos\\_sincronizacion.pdf](https://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/92-metodos_sincronizacion.pdf)
- Bhoraniya, H., Dhami, A., Naikoo, M., Parmar, B., y Sarvaiya, N. (2012). Effect of estrus synchronization protocols on plasma progesterone profile and fertility in postpartum anestrous Kankrej cows. *Tropical Animal Health and Production*, 44(6), 1191-1197. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0057-1>
- Bo, G., Huguenine, E., de la Mata, J., de Carneiro, R., y Menchaca, A. (2019). Pregnancy rates in suckled beef cows synchronized with a shortened progesterone/oestradiol-based protocol (J-synch) and inseminated with conventional or sexed-sorted semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 31, 129-139. doi:10.1071/RDv32n2Ab173
- Boeta, M., Balcázar, A., Cerbón, J., Hernández, J., Páramo, M., Zarco, L., y Valencia, J. (2018). Fisiología reproductiva de los animales domésticos. *México: FMVZ-UNAM*. doi: 978-607-30-0671-2
- Bravo Giler, L., y Ferrín Giler, C. (2021). *Dosis y efectos de gonadotropina coriónica equina en vacas y vaconas brahman sometidas a protocolos de sincronización*. [tesis, ESPAM, Ecuador]. Repositorio Institucional <https://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/1624>
- Castro, M., y González, C. (2018). *Modern methods of seminal evaluation in equine*. [tesis, Universidad Cooperativa de Colombia]. Repositorio Institucional [https://repositorio.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/12318/1/2019\\_metodos\\_modernos\\_evaluacion.pdf](https://repositorio.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/12318/1/2019_metodos_modernos_evaluacion.pdf)

- Colazo y Mapletoft. (2014). A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, 772. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4095965/>
- Colazo, M. K. (2003). Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*, 60(5), 855-865. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00091-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00091-8)
- Cole, H., Bigelow, M., Finkel, J., y Rupp, G. (1967). Biological half-life of endogenous PMS following hysterectomy and studies on losses in urine and milk. *Endocrinology*, 81(4), 927-930. <https://doi.org/10.1210/endo-81-4-927>
- De Leeuw , F., De Leeuw , A., Den Daas , J., Colenbrander , B., y Verkleij , A. (2016). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *National Center for biotechnology information*, 56. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8440128/>
- Elgueta , V. (2018). *Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos*. [tesis de grado, Universidad de las Américas, Chile]. Repositorio Institucional <https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Fernández, M., (2008). Ciclo estral de la vaca diagnóstico fotográfico. Servet Diseño y Comunicación. [C:/Users/Conexion%20Digital/Downloads/El%20Ciclo%20Estral%20de%20la%20Vaca%20\(Manuel%20Fern%C3%A1ndez%20S%C3%A1nchez\).pdf](C:/Users/Conexion%20Digital/Downloads/El%20Ciclo%20Estral%20de%20la%20Vaca%20(Manuel%20Fern%C3%A1ndez%20S%C3%A1nchez).pdf)
- Fernández, M., Estesó, M., Montoro, V., Soler, A. y Garde, J. (2006). Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of iberian red deer (*cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. *Journal of Andrology*, 27(6), 734-745. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000505>

- Filho, M., Ayres, H., Ferreira, R., Marques, M., Reis, E., Silva, R., Rodrigues, C., Madureira, E., Bó, G. y Baruselli, P. (2010). Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology*, 73(5), 651-658. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.004>
- Fricke, P. y Wiltbank, M. (1999). Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology*, 52(7), 1133-1143. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00205-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00205-8)
- Gamboa, H. (2020). *Evaluación de tres protocolos de sincronización para inseminación artificial a tiempo fijo en la respuesta reproductiva de vaquillas Senepol*. [tesis de Grado, ESPAM MFL]. Repositorio Institucional <https://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/1241>
- Gao, D., Liu, J., Liu, C., Mc Gann, L., Watson, P., Kleinhans, F., Mazur, P., Critser, E. y Critser, J. (1995). Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, 10(5), 1109-1122. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a13610>
- Garnica, F. (2013). *Efecto de la gonadotrofina coriónica equina (eCG) en la ovulación con protocolos de la IATF en vacas Holstein posparto*. [thesis, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/406/1/TESIS.pdf>
- Portillo, G., Gutiérrez, J., y Ondiz, A. (2015). Efecto de la Dosis de eCG sobre las Características Foliculares y Luteales, momento y Tasa de Ovulación de Novillas Mestizas Cebú Sincronizadas con Progestágeno Intravaginal. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 56(1), 035-041. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S02586576201500010005&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S02586576201500010005&lng=es&tlng=es)



- Gibb, Z., Morris, L., Maxwell, W. y Grupen, C. (2013). Dimethyl formamide improves the postthaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*, 79(7), 1027-1033. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.013>
- González, A. y Gonzalez, V. (2018). *Evaluación de espermatozoides de equino mediante una prueba de resistencia osmotica* [Tesis, Universidad autónoma de baja California] Repositorio Institucional <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/2718/1/VET008222.pdf>
- Gregg, A. y Singh, J. (2021). Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. *Bovine Reproduction*, 292-323. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch25>
- Gregory, K., Echterkamp, S., y Cundiff, L. (1996). Effects of twinning on dystocia, calf survival, calf growth, carcass traits, and cow productivity. *Journal of animal science*, 74(6), 1223-1233.
- Guillén, R., Quintero, M., y Villalobos, G. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Scielo*, 19(4), 29. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592009000400010](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000400010)
- Rubio, J., Quintero, A., y González, D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica*, 19(4), 382-389. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S079822592009000400010&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079822592009000400010&lng=es&tlng=es).
- Gutiérrez, L. (2014). *Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal* [tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. Repositorio Institucional <https://eprints.ucm.es/id/eprint/24898/1/T35236.pdf>

- Hammerstedt, Graham, J., y Nolan, J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *International Journal of Andrology*, 11(1), 73-88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2179184/>
- Hernández J. (2012). *Fisiología clínica de la reproducción de bovino lecheros*. file:///C:/EVELIN/D%C3%89CIMO/LEGISLACION/Fisiologia%20clinica%20de%20la%20reproduccion%20de%20bovinos%20lecheros-1.pdf
- Hittiger, M., y Ambrose, J. (2004). Luteolysis, onset of estrus, and ovulation in Holstein heifers given prostaglandin F<sub>2α</sub> concurrent with, or 24 hours prior to, removal of an intravaginal, progesterone-releasing device. *Canadian journal of veterinary*, 283. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1111359/>
- Jimenez A. (2019). *El Ciclo Estral Bovino*. Diamond. <https://bmeditores.mx/ganaderia/el-ciclo-estral-bovino-2163/>
- Joosten I, Hensen EJ, (1992). Retained placenta: an immunological approach. *Animal Reprod Sci*, 28:451-461.
- Kinsel, M., Marsh, W., Ruegg, P., y Etherington, W. (1998). Risk factors for twinning in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 989-993.
- Ko, J., Kastelic, J., Del Campo, M., y Ginther, O. (1991). Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *Reproduction*, 91(2), 511-519. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910511>
- Lopez, H., Caraviello, D., Satter, L., Fricke, P., & Wiltbank, M. (2005). Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2783-2793.
- Lopez, H., Sartori, R., y Wiltbank, M. (2005). Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle<sup>1</sup>.

DesCoteaux, L., Colloton, J., y Gnemmi, G. (2010). *Ruminant and camelid reproductive*

*ultrasonography*.file:///C:/Users/Conexion%20Digital/Downloads/Ruminant%20and%20Camelid%20Reproductive%20Ultrasonography.pdf

Madeiros , A., Gomes, G., Carmo, M., y Papa , F. (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Published*, 29. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/285714636\\_Cryopreservation\\_of\\_stallion\\_sperm\\_using\\_different\\_amides](https://www.researchgate.net/publication/285714636_Cryopreservation_of_stallion_sperm_using_different_amides)

Martínez, M., Kastelic, J., Bó, G., Caccia, M. y Mapletoft, R. (2005). Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science*, 86(1-2), 37-52. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.06.005>

Martínez, M., Tutt, D., Quirke, L., Tattersfield, G. y Juengel, J. (2014). Development of a GnRH-PGF2 $\alpha$ -progesterone-based synchronization protocol with eCG for inducing single and double ovulations in beef cattle<sup>1,2</sup>. *Journal of Animal Science*, 92(11), 4935-4948. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7512>

Martínez-Ros, P. y Gonzalez-Bulnes, A. (2019). Efficiency of CIDR-Based Protocols Including GnRH Instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals*, 9(4), 146. <https://doi.org/10.3390/ani9040146>

Martins, J., Policelli, R., Neuder, L., Raphael, W., y Pursley, J. (2011). Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2 $\alpha$  of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2815-2824. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3652>

Martinuk, S., Manning, A., Black, W. y Murphy, B.(1991). Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in

vivo. *Biology of Reproduction*, 45(4), 598-604.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod45.4.598>

Matamoros, R., Gomez, M., y Andaur, T. (2002). Hormones of diagnostic value in Veterinary Medicine. *Archivos de medicina veterinaria*. doi:ISSN 0301-732X

Meléndez, P., Gonzalez, G., Aguilar, E., Loera, O., Risco, C. y Archbald, L. (2006). Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4567-4572.  
[https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72506-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72506-1)

Menzer, C. y Schams, D. (1979). Radioimmunoassay for PMSG and its application to in-vivo studies. *Reproduction*, 55(2), 339-345.  
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0550339>

Meryman, H. (2007). Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*, 47(5), 935-945. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01212.x>

Mesa, A., y Henao , G. (2012). Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2908-2915.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682012000100014&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682012000100014&lng=en&tlng=es).

Mion, B., Bonotto, R., Oliveira, C., Souza, F., Bonotto, A., Pradiee, J., Tomazele, M., Cantarelli, L., Martins, A., Machado, L. y Schneider, A. (2019). J-Synch protocol associated with estrus detection in beef heifers and non-lactating cows. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, 13(2), 269. <https://doi.org/10.26605/medvet-v13n2-3089>

Moore, A., Squires, E., Bruemmer, J. y Graham, J. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26(5), 215-218. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.03.003>

- Morillo, A. (2013). *Evaluación de crioprotectores alternativos, glicerol y antioxidantes en la congelación del eyaculado equino* [tesis, Universidad Extremadura]. Repositorio Institucional <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=38177>
- Neglia, G., Gasparrini, B., Di Palo, R., De Rosa, C., Zicarelli, L. y Campanile, G. (2003). Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian mediterranean buffalo cows. *Theriogenology*, 60(1), 125-133. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01328-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01328-6)
- Olivares, M. y Videa, T. (2021). *Protocolos de sincronización de celo (Ovsynch modificado vs DIV-B®) en vaquillas de la finca la Esperanza*. [tesis, Universidad Nacional Agraria de Matiguas -Matagalpa]. Repositorio Institucional <https://repositorio.una.edu.ni/4360/1/tnl53o48.pdf>
- Olivera, N., Cuadro, F., Bosolasco, D., de Brun, V., de la Mata, J., Brochado, C., Meikle, A., Bó, G. y Menchaca, A. (2020). Effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration and proestrus length on ovarian response, uterine functionality and pregnancy rate in beef heifers inseminated at a fixed-time. *Theriogenology*, 151, 16-27. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.031>
- Olivo , M., y Cueva, F., (2019). *Elaboración de un Proyecto en Metodología Marco Lógico de Producción del Ganado Caballar de la Unidad de Equitación y Remonta de la Policía Nacional del Ecuador*. [tesis de grado , Universidad Central del Ecuador, Quito]. Repositorio Institucional <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20276/1/T-UCE-0014-MVE-080.pdf>
- Palma, G., y Brem , G. (2016). Biotecnología dela reproducción. *Theriogenology*, 25. [http://www.reprobiotec.com/libro\\_azul/cap\\_01.pdf](http://www.reprobiotec.com/libro_azul/cap_01.pdf)
- Palomares, S. (2009). *Revisión de los protocolos empleados en la sincronizacion de celos en bovinos*. [Tesis, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales]. Repositorio Institucional <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/103>

- Parish J. (2016). El ciclo estral del ganado. *Mississippi State University*.  
[https://extension.msstate.edu/sites/default/files/publications/publications/p2616\\_0.pdf](https://extension.msstate.edu/sites/default/files/publications/publications/p2616_0.pdf)
- Perry G. (2020). El ciclo estral bovino. *SDSU Extension*.  
<https://extension.sdstate.edu/sites/default/files/2020-09/P-00167.pdf>
- Portillo, G., Gutiérrez, J., y Ondiz, A. (2015). Efecto de la dosis de ecg sobre las características foliculares y luteales, momento y tasa de ovulación de novillas mestizas cebú sincronizadas con progestágeno intravaginal. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, 56(1), 35-41.
- Puga, T., Blum, R., Blum, N., Sorroza, R., Cajas, F., López, M., y Aray, A. (2018). Relation between basal sperm morphology and sperm recovered by swim up. *Recimundo*, 3(2), 89.  
<https://www.recimundo.com/index.php/es/article/view/285>
- Pursley, J., Mee, M., y Wiltbank, M. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub>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)
- Quirk, S., Hickey, G., y Fortune, J.(1986). Growth and regression of ovarian follicles during the follicular phase of the oestrous cycle in heifers undergoing spontaneous and PGF-2 -induced luteolysis. *Reproduction*, 77(1), 211-219.  
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0770211>
- Raouf , G. A., Abou-Ahmed, M., Fad, A., El-Badry, D., Shahat , A., y Moawad , A. (2019). Optimization of the protocol for cryopreservation of arabian stallion spermatozoa: effects of centrifugation, semen extenders and cryoprotectants. *Cryo letters*, 40(2), 129-138. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31017613/>
- Re, M., Mata, J., y Bo, G. (2014). Synchronization of ovulation in dairy heifers using a shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1), 118.  
<https://doi.org/10.1071/rdv26n1ab8>

- Rensis, F., y López-Gatius, F. (2014). Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), 177-182. <https://doi.org/10.1111/rda.12268>
- Restrepo , B., Usuga , S., Montoya , P., Celis, Á., y Henao, A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de Investigación*, 11(2), 63-70. <https://doi.org/10.22507/rli.v11n2a7>
- Sagbay, C. (2012). *Efecto de la gonadotropina corionica equina (eCG) aplicada al momento de retirar el dispositivo de progesterona (p4) sobre el porcentaje de preñez en vacas holstein post-parto*. [tesis, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/2419/15/UPS-CT002426.pdf>
- Sartori, R., Haughian, J., Shaver, R., Rosa, G. y Wiltbank, M. (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 905-920. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(04\)73235-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(04)73235-x)
- Schatten, H., y Constantinescu, G. (2007). *Comparative Reproductive Biology*. Australia.file:///C:/Users/Conexion%20Digital/Downloads/Comparative%20Reproductive%20Biology%202007.pdf
- Smith, B. I., y Risco, C. A. (2002). Predisposing factors and potential causes of postpartum metritis in dairy cattle. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 24: S74-S80
- Singh, J., y Adams, G., (2021). Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. *Bovine Reproduction*,. Canada. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119602484.ch25>



- Sirois, J. y Fortune, J. E. (1990). Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, 127(2), 916-925. <https://doi.org/10.1210/endo-127-2-916>
- Souza, A., Viechnieski, S., Lima, F., Silva, F., Araújo, R., Bó, G., Wiltbank, M. y Baruselli, P. (2009). Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*, 72(1), 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.025>
- Squires, E., Keith, S. y Graham, J. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1056-1065. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.024>
- Stevenson, J., Tiffany, S. y Lucy, M. (2004). Use of estradiol cypionate as a substitute for gnrh in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3298-3305. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(04\)73466-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(04)73466-9)
- Suárez, D. A. O., Colombia, V., y de Reproducción Bovina, S. D. P. (2020). Bases farmacológicas y actualización de la sincronización del celo bovino pharmacological bases and current aspects of bovine heat synchronization. [https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/17467/1/2020\\_bases\\_farmacol%C3%B3gicas\\_actualizaci%C3%B3n.pdf](https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/17467/1/2020_bases_farmacol%C3%B3gicas_actualizaci%C3%B3n.pdf)
- Tortorella, R., Ferreira, R., Tonello, J., Silveira, O., Barreta, M., Oliveira, J., Gonçalves, P. y Pereira, J. (2013). The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology*, 79(8), 1204-1209. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.019>
- Underwood et al. (2010). Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 7-12. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.06.004



- Uribe L., y Franco J. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas ruminantes. *Biosalud*, 11(1), 41-56.
- Vidament, C., Daire, J., Doligez, B., Bruneau, M., Magistrini y Ecot. (2002). Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, 58(2-4), 249-251. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00854-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00854-3)
- Yáñez-Avalos, D., López, J., Moyano, J., Quinteros, R. y Marini, P. (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>
- Yáñez-Avalos, D., Barbona, I., López, J., y Marini, P. (2021). Protocolo J-synch con y sin eCG en vacas Brown Swiss y sus cruzas con Bos Indicus en la amazonía ecuatoriana. *La Granja*, 33(1), 8-20. <https://doi.org/10.17163/lgr.n33.2021.01>
- Zacarias, S., Sena, Santos, Machaim, y Figueiredo. (2015b). Ovarian follicular dynamics in 2 to 3 months old Nelore calves (*Bos taurus indicus*). *Animal reproduction*, 12(2), 305-311. [http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n2/p305-311%20\(AR699\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n2/p305-311%20(AR699).pdf)
- Zurita , B. (2019). *Evaluación de glicerol, etilenglicol, dimetilformamida y dimetilacetamida como agentes crioprotectores durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de Alpaca*. [tesis de grado , Universidad Científica del Sur , Lima]. Repositorio Institucional <https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/1335/TL-Zurita%20R.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

## Anexos



Anexo A. Ecografía de vaconas antes de iniciar el protocolo de sincronización.



Anexo B. Materiales para realizar ecografía.



Anexo C. Materiales para la toma de muestras sanguíneas y su almacenamiento.



Anexo D. Toma de muestras sanguíneas



Anexo E. Centrifugación y almacenamiento de las muestras sanguíneas