

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

***“Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU)
en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con
FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas”***

Tesis previa a la obtención del Título
de: Médico Veterinario Zootecnista.

AUTOR

Jorge Xavier Samaniego Campoverde C.I 0105163489

DIRECTOR

Luis Eduardo Ayala Guanga, PhD C.I 0102635463

CUENCA-ECUADOR

2017

RESUMEN

La presente investigación se realizó en la granja experimental Irquis de la Universidad de Cuenca. El objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad y cantidad de ovocitos recuperados en dos tiempos diferentes de OPU (40 y 48h) sobre la calidad y cantidad de Complejos cumulus ovocitos (COC's) recuperados mediante Ovum pick up (OPU), después de un protocolo de estimulación ovárica a base de FSH-LH (Pluset®) en vaquillas de genotipo Criollo. Se realizaron 22 sesiones de OPU divididas en cuatro tratamientos. Se analizaron 330 datos en total y 15 variables; se utilizó un modelo lineal general para el análisis de los datos a través del SAS versión 9,3 y el procedimiento MEANS, en la determinación de estadísticos descriptivos de las variables. Además, se utilizó el Test de Tukey-Kramer, para la comparación entre las medias mínimo cuadráticas. Los tratamientos OPU 40h y OPU 48h permitieron obtener dos veces más COC's (8,2 y 9,8 respectivamente), frente a los que no recibieron estimulación ovárica (testigo 40h y testigo 48h), presentando diferencia estadística ($P < 0,05$). Se obtuvo tres veces más COC's de calidad A en el tratamiento OPU 48 h y el 100% de estas estructuras reaccionaron positivamente a la prueba de azul brillante de Cresilo (BCB+), es decir terminaron su crecimiento y se encontraban listos para iniciar el proceso de maduración *in vitro*. Se concluye que el tratamiento OPU 48h permite obtener mayor calidad y cantidad de COC's recuperados y aptos para el proceso de PIV.

PALABRAS CLAVE: COC'S, ESTIMULACIÓN OVÁRICA, OPU, PRUEBA BCB

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the experimental farm Irquis of the University of Cuenca. The objective of the present study was to evaluate the quality and quantity of oocytes recovered at two different times of OPU (40h and 48h) on the quality and quantity of COC's recovered by Ovum pick up (OPU), after an ovarian stimulation protocol based FSH-LH (Pluset®) in heifers of Creole genotype. Twenty two OPU sessions were divided into four treatments. We analyzed 330 data in total and 15 variables, a general lineal model was used for the analysis of the data through the SAS version 9,3 and MEANS procedure in the determination of descriptive statistics of the variables. In addition, the Tukey-Kramer test was used for the comparison between the least squares media. The treatments OPU 40h and OPU 48h allowed to obtain twice as many COC's (8,2 and 9,8 respectively), compared to those who did not receive ovarian stimulation (40h control and 48h control), presenting statistical difference ($P<0,05$). Three times more COC's of quality A were obtained in the OPU 48 treatment and 100% of these structures reacted positively to the bright blue test of cresyl (BCB+), that is to say they finished their growth and they were ready to initiate the process of maturation *in vitro*. It is concluded that the OPU 48h treatment allows to obtain higher quality and quantity of COC's recovered and suitable for the PIV process.

KEY WORDS: COC'S, OVARIAN STIMULATION, OPU, BCB TEST

INDICE DE CONTENIDO

1.INTRODUCCION	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 <i>Objetivo general</i>	3
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	3
1.2 HIPÓTESIS.....	3
2.REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 FISIOLOGIA DEL CICLO ESTRAL BOVINO	4
2.1.1 <i>Sistema nervioso y sistema hormonal</i>	4
2.1.2 <i>Control Hipotálamo Hipófisis en la reproducción</i>	5
2.1.3 <i>Liberación de gonadotropinas</i>	7
2.1.4 <i>Fisiología del gameto femenino</i>	8
2.1.5 <i>Mecanismo de la ovulación</i>	11
2.1.6 <i>Funciones, formación y regresión del cuerpo lúteo</i>	12
2.1.7 <i>Fases del ciclo estral</i>	14
2.1.8 <i>Dinámica folicular</i>	16
2.2 ASPIRACION FOLICULAR TRANSVAGINAL (OPU)	18
2.2.1 <i>Procedimiento para OPU</i>	20
2.2.2 <i>Ventajas de OPU</i>	23
2.3 BRILLANTE DE CRESILO	26
3.MATERIALES Y METODOS.....	27
3.1 MATERIALES.....	27
3.1.1 <i>Materiales biológicos</i>	27
3.1.2 <i>Materiales de campo</i>	27

3.1.3	<i>Materiales de laboratorio</i>	28
3.1.4	<i>Materiales químicos</i>	28
3.2	METODOS.....	29
3.2.1	<i>Área de estudio</i>	29
3.2.2	<i>Metodología para la Investigación Experimental (campo)</i>	29
3.2.3	<i>Metodología para la Investigación Experimental (laboratorio)</i>	31
3.2.4	<i>Análisis Estadístico</i>	33
3.2.5	<i>Variables de estudio</i>	34
4	RESULTADOS Y DISCUSION	35
4.1	NUMERO DE FOLÍCULOS VISUALIZADOS Y COC'S RECUPERADOS.....	35
4.2	CALIDAD DE LOS OVOCITOS.....	39
4.3	RESPUESTA DE LOS OVOCITOS AL AZUL BRILLANTE DE CRESILO (BCB).....	42
4.3.1	<i>Actividad negativa al BCB</i>	45
5	CONCLUSIONES	47
6	BIBLIOGRAFÍA	48
7	ANEXOS	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación de las interacciones hormonales del eje Hipotálamo- Hipófisis- Ovario	6
Figura 2: Representación esquemática del desarrollo folicular en rumiantes. ...	9
Figura 3: Síntesis de estradiol	11
Figura 4: Transporte de la PGF ₂ α a través de la vena uterina-arteria ovárica .	14
Figura 5: Fases del ciclo estral bovino	16
Figura 6: Esquema representativo de la dinámica folicular durante el ciclo estral bovino.....	18
Figura 7: División Política Territorial del Cantón Cuenca.	29
Figura 8: Folículos visualizados, COC's recuperados con su respectivo porcentaje en cada tratamiento	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Media y error estándar del número de los folículos visualizados y COC's recuperados por OPU en cada uno de los tratamientos.....	37
Tabla 2: Número de COC's recuperados de acuerdo al tratamiento de estimulación ovárica y de la calidad ovocitaria (Media \pm error estándar).	41
Tabla 3: Número de ovocitos que reaccionaron positivamente al Azul Brillante de Cresilo (BCB) de acuerdo al tratamientos y a la calidad ovocitaria (Media \pm error estándar).....	44

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1: Ovocito categoría I.....	21
Fotografía 2: Ovocito categoría II.....	22
Fotografía 3: Ovocito categoría III.....	22
Fotografía 4: Ovocito categoría IV.....	22
Fotografía 5: Ovocito categoría V.....	23

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Materiales y equipos empleados	55
Anexo 2: Hormona superovulatoria	60
Anexo 3: Operacionalización de las variables	61
Anexo 4: Hoja de campo general para las diferentes repeticiones.....	62
Anexo 5: Cronograma de actividades a realizarse por maniobra	63
Anexo 6: Hoja de campo para valoración ecográfica de los folículos.....	64
Anexo 7: Procedimiento a nivel de campo	65
Anexo 8: Procedimiento a nivel de laboratorio	67

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero que transfiere el código genético

BCB: Azul brillante de Cresilo

COC's: Complejo cumulus ovocitos

CL: Cuerpo Lúteo

E2: Estradiol

FIV: Fertilización *in vitro* de embriones

FSH: Hormona Foliculoestimulante

G6PD: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

GnRH: Hormona liberadora de Gonadotropinas

IM: via Intramuscular

Kg: Kilogramo

LH: Hormona Luteinizante

mg: Miligramo

ml: Mililitro

mm: Milímetros

µm: Microlitro

OPU: Ovum Pick Up

P4: Progesterona

PGF2α: Prostaglandina

PIV: Producción *in vitro* de embriones

SC: via Subcutánea

SOV: Superovulacion

TE: Transferencia de embriones

UI: Unidades internacionales

CLAUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

Yo *Jorge Xavier Samaniego Campoverde*, autor de la tesis “**Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **Médico Veterinario Zootecnista**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 12 de junio de 2017



Jorge Xavier Samaniego Campoverde

C.I: 0105163489

CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo *Jorge Xavier Samaniego Campoverde*, autor de la tesis “**Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 12 de junio de 2017



Jorge Xavier Samaniego Campoverde

C.I: 0105163489

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco infinitamente a Dios, por haberme dado fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida.

Agradezco también a mi madre, que sin duda alguna me ha demostrado que los grandes esfuerzos tienen grandes recompensas.

A mi padre que por motivos de trabajo siempre estuvo lejos pero que rompió la barrera de la distancia para apoyarnos en los grandes y pequeños proyectos.

A mi hermano Andres por su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria.

A Karlita que me apoyo de inicio a fin, no solo en la realización de mi tesis si no en el trascurso de mi recuperación, gracias por los momentos inolvidables que compartimos día a día

A los muchachos de decimo ciclo promoción 2016 que colaboraron en la realización de mi tesis cuando por motivos de salud no podía estar presente.

A los Doctores Daniel Argudo y Fernando Perea por la ayuda incondicional brindada con los cuales mantendré una deuda infinita.

A mi director de tesis y amigo Dr. Luis Ayala con el cual siempre mantendré una deuda infinita, por su apoyo ilimitado, sus ideas y su tiempo brindado para que esta tesis se haya hecho realidad.

Y gracias a todos los que me han brindado su granito de arena en mi desarrollo profesional.

JORGE XAVIER SAMANIEGO CAMPOVERDE

DEDICATORIA

A ti Dios creador de todas las cosas que cuando más te necesite estuviste ahí a ti te dedico primeramente esta tesis, además, que sin tu infinito amor, bondad y salud no hubiera podido llegar hasta este sublime momento.

De igual forma y con orgullo dedico esta tesis a mis benefactores; Mis Padres Jorge y Janeth que, gracias a su aporte económico, su paciencia y sus consejos permitió la realización de esta Tesis, también por haberme educado de la manera más humana posible siempre basados en la humildad, el cariño, el respeto y la responsabilidad. No puedo olvidarme de mi hermano Andres con el que siempre compartimos las victorias y las penas, este logro también te dedico a ti.

A mi director de tesis que además de haber sido mi profesor y gran amigo asido mi guía, gracias por su tiempo, por su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitió en el desarrollo de esta tesis y en mi formación profesional.

Y, por último, pero no menos importante dedico este logro a Karla Sevilla por haberme apoyado en los buenos y malos momentos.

JORGE XAVIER SAMANIEGO CAMPOVERDE



1. INTRODUCCION

El ganado bovino de genotipo Criollo del Ecuador adaptó su constitución y aptitudes productivas a las variadas condiciones ambientales de la región a través del tiempo y adquirió características importantes como rusticidad, adaptabilidad y resistencia a las enfermedades (1,2). Sin embargo, por ser consideradas poco productivas, estas poblaciones de animales Criollos paulatinamente han sido sustituidas o absorbidas por razas lecheras más especializadas (3). En 2006 la FAO (4) determinó que el 20% de las razas autóctonas del mundo están en peligro de extinción. Como medida de conservación del material genético bovino autóctono en los últimos años, a nivel mundial, se viene estudiando el comportamiento de la dinámica folicular en ganado Criollo con la finalidad de crear bancos de material genético de estos grupos genéticos en peligro de extinción (5).

Una de las biotecnologías implementadas para la multiplicación del material genético ha sido la transferencia de embriones a partir de la superovulación, la cual se ha tornado ineficiente debido al reducido número de embriones transferibles y a la alta variabilidad de los resultados en cada proceso (6). Como alternativa para superar estas limitantes la aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU), reportada por Pieterse *et al.*, (7), ha demostrado ser exitosa y reproducible para obtener ovocitos a partir de vacas y novillas, y que acoplada a la producción *in vitro* de embriones (PIV), constituye una herramienta más eficiente que la superovulación y la transferencia de embriones convencional.



En la actualidad, OPU representa una alternativa viable para satisfacer las necesidades de gametas en un sistema de producción de embriones *in vitro*, debido a que permite reutilizar a vacas donantes de ovocitos a intervalos más cortos de tiempo; además, el material recolectado es de procedencia conocida, y si proviene de vacas de alto valor genético conduce a mejorar el desempeño productivo del rebaño (8).

Para obtener un mayor número de gametas mediante OPU, es necesario realizar pre-estimulación hormonal antes de la sesión de OPU (9). En un principio se utilizaron los protocolos de superovulación establecidos para la obtención de embriones *in vivo* (10); Aunque Blondin *et al.* (11) y Chaubal *et al.* (12) observaron que el uso de gonadotropinas les permitía obtener un mayor rendimiento en cuanto a la calidad y cantidad de los ovocitos recuperados, en años recientes Ruiz *et al.* (13) señalaron que estos protocolos producían un desarrollo folicular y ovocitario asincrónico que afectaba la calidad de los ovocitos obtenidos. De allí que la utilización de FSH y LH en conjunto podría promover la maduración simultánea del folículo y del ovocito, obteniéndose gametas de mejor calidad (6). Por lo tanto, con el fin de optimizar el método se ha venido trabajando en factores biológicos y técnicos como la estimulación hormonal, el momento de la aspiración folicular luego de la aplicación hormonal, la raza de la donante, todo lo cual pueden afectar la calidad de los ovocitos (14).



1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Evaluar la calidad y cantidad de ovocitos recuperados en dos tiempos diferentes, luego de un proceso de estimulación ovárica a base de FSH-LH (Pluset®), en vaconas de raza Criolla bajo un sistema de manejo pastoril.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar el número de folículos mayores a 5 milímetros obtenidos del proceso de estimulación ovárica con los dos tratamientos del estudio.
- Valorar el número y calidad de los COC'S recuperados por OPU en dos tiempos diferentes, mediante el estudio de las células del cumulus y actividad citoplasmática.

1.2 Hipótesis

El número y la calidad de los COC'S obtenidos de un proceso de estimulación ovárica a base de FSH-LH (Pluset®), varían de acuerdo al tiempo de recuperación post aplicación de la hormona.



2. REVISION DE LITERATURA

2.1 FISILOGIA DEL CICLO ESTRAL BOVINO

En la última década se ha logrado comprender ampliamente la fisiología reproductiva del ganado vacuno, en especial el tema relacionado con la función ovárica y el ciclo estral, debido a que permite al bovino ir de un periodo de no receptividad a uno de receptividad, para de esta manera permitir el apareamiento y la perpetuación de la especie (15).

Es importante reconocer que el ciclo estral bovino es un proceso dinámico y complejo que depende de la interacción ordenada de varios órganos (Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas) para cumplir la función específica de perpetuar la especie (16).

2.1.1 Sistema nervioso y sistema hormonal

Sistema Nervioso: Las señales sensoriales generadas por los órganos de los sentidos (vista, olfato y tacto), son transmitidas al cerebro en forma de mensajes que deberán ser traducidos por el cerebro y enviados en forma de impulsos mediante la ayuda de las fibras nerviosas hasta el órgano diana (hipotálamo) el cual junto con la hipófisis son la unidad activa y dominante encargadas de dirigir la función sexual (17).

Sistema Hormonal: Una hormona es una sustancia producida por una glándula, que tiene la capacidad de producir una reacción en un tejido sensible, estas hormonas se encuentran reguladas por procesos de retroalimentación (positiva o negativa), impulsos nerviosos o por distintos órganos (18). Por lo cual se subdividen según la forma en la que llegan a las células diana en:



- Hormonas endocrinas: Son hormonas sintetizadas y almacenadas en la glándula que las produce; además de ser secretadas y transportadas en la sangre a un órgano distante de la fuente.
- Hormonas paracrinas: La hormona entra a la circulación e interactúa con los receptores vecinos ubicados a corta distancia.
- Hormonas autocrinas: Son aquellas en la que el producto de la secreción solo opera dentro del mismo citoplasma o sobre su propio receptor de membrana (19).

2.1.2 Control Hipotálamo Hipófisis en la reproducción

La actividad gonadal está bajo control del hipotálamo y de la hipófisis anterior (adenohipófisis). El hipotálamo es una estructura pequeña localizada en la parte central de la base del cerebro; Este tiene grupos neuronales (núcleos) encargados de secretar hormonas peptídicas, la hormona GnRH se produce en el núcleo preóptico interno y se dirige mediante un sistema porta venoso a la hipófisis que responde sintetizando hormonas (FSH, LH y prolactina) que son importantes para el control gonadal (20).

La glándula hipofisiaria se divide en tres partes importantes: 1). Lóbulo anterior (adenohipófisis); 2). Lóbulo intermedio (pars intermedia); y 3). Lóbulo posterior (neurohipófisis), que además de tener diferente origen embriológico, cada lóbulo tiene la capacidad de producir diferentes grupos de hormonas, de los cuales la adenohipófisis produce hormonas proteicas de gran importancia que son: la hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y prolactina. La FSH será la responsable del proceso de esteroideogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular y la LH por su parte intervendrá mayormente en los

estadios finales, desde la maduración hasta la ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Por otra parte, la prolactina intervendrá sobre la glándula mamaria y la lactación (21).

Las hormonas (FSH y LH) son glicoproteínas conformadas por dos cadenas polipeptídicas α y β . La cadena α le confiere la especificidad de especie y la β difiere y produce la especificidad biológica. El sitio de acción de estas dos hormonas es a nivel de los receptores ubicados sobre la membrana celular y estimulación del adenilato ciclasa (22). Las hormonas LH y FSH serán llevadas a la circulación en forma de pulsos reguladas por el sistema tónico y cíclico. El tónico producirá niveles basales circulantes encargados del desarrollo de elementos germinales y endocrinos de las gónadas, y por otra parte el cíclico que será el encargado de la ovulación en primera instancia, pero también interviene en el mecanismo del parto, bajada de leche, transporte espermático y en el proceso de luteólisis (23).

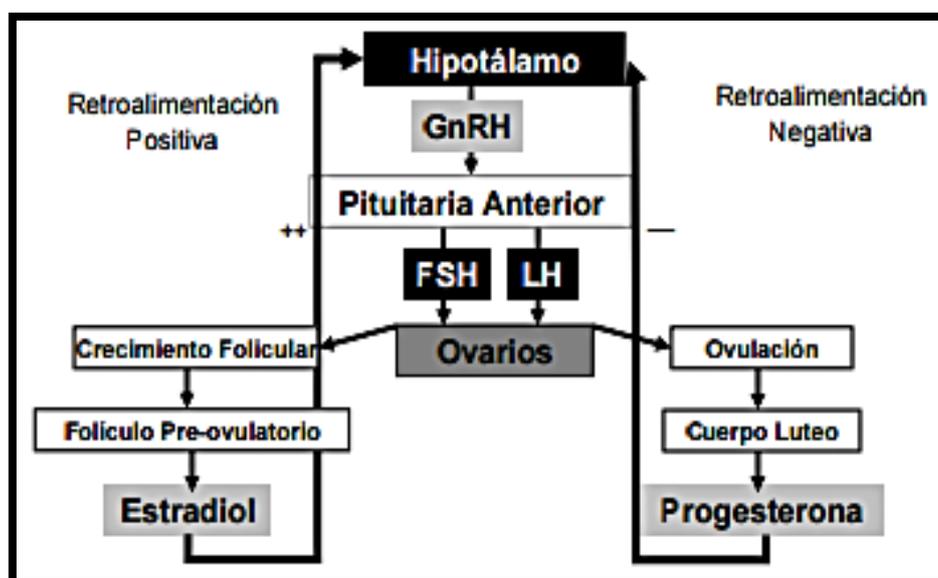


Figura 1: Representación de las interacciones hormonales del eje Hipotálamo-Hipófisis- Ovario (16).



2.1.3 Liberación de gonadotropinas

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es aquella que determina el patrón pulsátil de liberación de gonadotropinas. En general, el sistema generador de pulsos para la liberación de gonadotropinas aumenta en fase folicular y decrece en fase luteínica. La liberación de estrógenos reducirá la amplitud del pulso y la progesterona disminuirá la frecuencia de secreción de gonadotropinas, en otros términos, durante la fase folicular la frecuencia del pulso incrementa por la ausencia de progesterona (P4), mientras que su amplitud decrece por presencia de los estrógenos (E2). Este incremento de frecuencia y disminución en amplitud es la base fundamental de la fase final de crecimiento folicular. El aumento súbito en la secreción de gonadotropinas produce cambios dentro del folículo que desencadenará en la ovulación (rotura folicular). Las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) tienen la capacidad de modificar la secreción de gonadotropinas (20).

Además; los estrógenos provenientes del folículo ovárico tienen acciones sobre distintos órganos como: las trompas de Falopio, útero, vagina, vulva y SNC, en el cual provocan la conducta de celo y en el hipotálamo donde ejercen una retroalimentación negativa (feed back negativo) sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico. La progesterona es producida por el cuerpo lúteo por acción de la LH, esta hormona prepara el útero para la implantación del embrión y para mantener la gestación. A nivel hipotalámico ejerce un efecto feed back negativo sobre el centro tónico. La inhibina es producida por el folículo a nivel de las células de la granulosa, esta hormona inhibe la secreción de gonadotropinas



sobre todo intervendrá en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH. Ejerciendo una retroalimentación negativa (feed back negativo) a nivel hipofisiario, produciendo una mínima secreción de FSH (24).

2.1.4 Fisiología del gameto femenino

En la mayoría de los mamíferos, la proliferación de los ovogonios (ovogénesis) se produce por división mitótica en la etapa fetal (en el bovino proliferan alrededor del día 50 hasta el 130 de la gestación) de los cuales algunos aumentaran de tamaño y llegaran a diferenciarse en ovocitos primarios. A partir de los 80-90 días de vida fetal bovina, los ovocitos primarios replican su ADN e inician la profase de la primera meiosis. Llegado el día 95 de gestación bovina, sucede que el número de ovogonios y de ovocitos primarios que se encuentran en el proceso de mitosis, se reducirá en número debido a una muerte celular programada y quedaran solo los ovogonios y los ovocitos en profase I que se encuentren en la superficie ovárica. La cantidad de ovocitos al momento del nacimiento en la especie bovina se calcula que es de 175.000 (25).

Además, antes del nacimiento, todos los ovocitos han iniciado la profase I, la cual no llega a ser culminada debido a que se detendrán en el estadio de diploteno, hasta la pubertad, este largo periodo de permanencia en profase I es producida por la presencia de la sustancia inhibidora de la maduración que será secretada por las células foliculares (26)

Cuando se origina el pico preovulatorio de LH, los ovocitos reinician su meiosis I, dando lugar a dos células con diferente cantidad citoplasmática, pero con la misma carga de cromosomas dobles. Una de estas se volverá el ovocito

secundario y la otra el primer cuerpo polar, el cual permitirá reducir el número de cromosomas sin comprometer los componentes intracelulares importantes para el ovocito; Después de haber culminado la meiosis I, se inicia inmediatamente la meiosis II en el cual se detendrá en la etapa de metafase II; todos los ovocitos que son ovulados se encuentran en metafase II y si este es fecundado o activado artificialmente retomara su meiosis y se transformara en ovulo, de lo contrario en 24 horas aproximadamente luego de la ovulación se degenerara (25).

Por otra parte; Los folículos ováricos se desarrollan (foliculogénesis) a partir de los folículos primordiales en diferentes etapas morfológicas (Figura 2) que involucra el crecimiento del ovocito que inicia de la división de células foliculares planas (células pregranulosas) hasta formar la granulosa (células cubicas), esta granulosa será la encargada de secretar otra sustancia de delimitación conocida como zona pelúcida. La teca por su parte deberá cubrir la membrana propia hasta completar las capas celulares foliculares. En este momento el folículo toma el nombre de folículos preantrales o primarios (20).

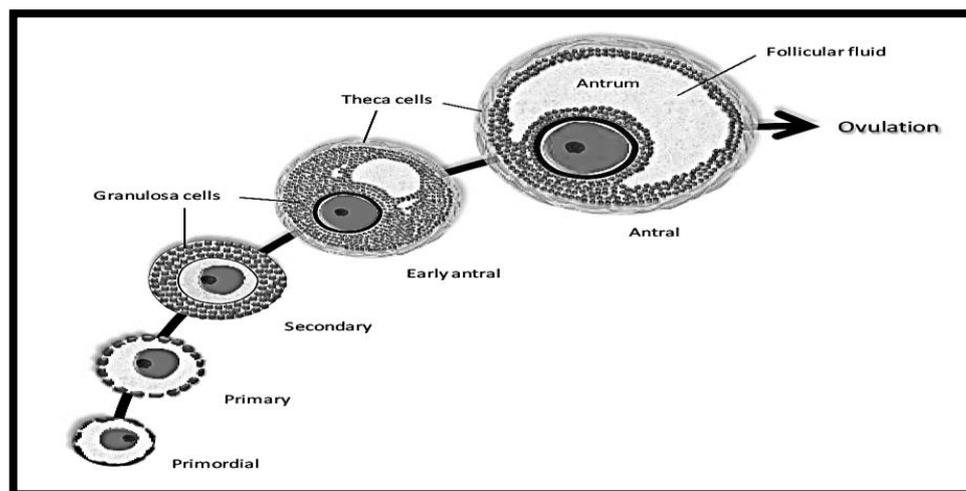


Figura 2: Representación esquemática del desarrollo folicular en rumiantes (27).



Para que un folículo se vuelva secundario debe haber la multiplicación de las capas celulares cubicas de la granulosa e invasión capilar entre las células que rodean al folículo y la trama fibrosa a esta se la denomina teca interna, la cual va a proveer de nutrientes al ovocito y a su granulosa, además, por fuera se encuentran altas cantidades de tejido conectivo y fibroblastos denominada teca externa (22).

En la siguiente fase de desarrollo folicular, los folículos preantrales necesitan desarrollar receptores para gonadotropinas, los receptores para FSH se desarrollan en la granulosa y los receptores de LH en la teca. Un folículo se vuelve antral cuando la granulosa se divide a consecuencia de un líquido (licor folicular) proveniente de las células de la granulosa, en la fase posterior el oocito permanece cubierto por el cumulus oophorus (granulosa), que se mantiene unido a la pared folicular, esta proximidad permite la síntesis conjunta de estrógenos (20).

La capa tecal será la encargada de producir andrógenos (androstenediona y testosterona) en este momento bajo la influencia de LH, que se difundirá desde la membrana propia hasta la granulosa para transformar los andrógenos en estrógenos (17-estradiol), mediante el mecanismo de dos células que tiene como teoría que la granulosa es incapaz de producir andrógenos que son los precursores de los estrógenos, y la teca tiene una capacidad limitada para la producción de estrógenos.

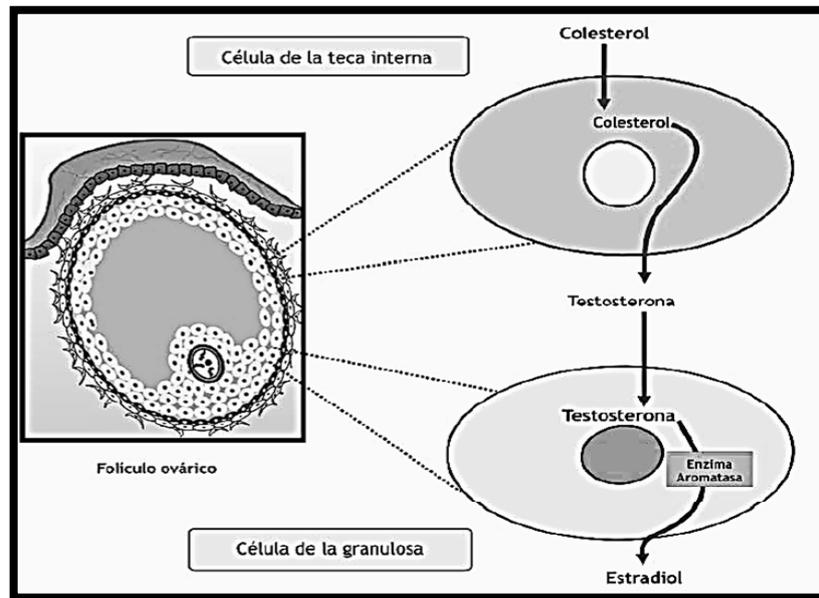


Figura 3: Síntesis de estradiol (teoría de las dos células) (28).

En este momento los estrógenos participan como formadores de receptores adicionales de FSH, por lo cual el folículo antral se hace progresivamente más sensible a FSH según se va desarrollando, hasta llegar a un estadio tardío en la que los receptores de LH se desarrollan en la granulosa lo que permitirá el pico preovulatorio que provocará la ovulación (17).

2.1.5 Mecanismo de la ovulación

En el ganado bovino, los ciclos foliculares son disparejos debido a que folículo dominante desaparece en la mitad de la fase luteínica e inmediatamente el segundo folículo comienza a crecer y si este se encuentra en desarrollo cuando se inicie la regresión del cuerpo lúteo será el folículo preovulatorio. Un folículo antral requiere aproximadamente 10 días para su desarrollo, el cual se encuentra dividida en dos fases: una fase lenta que dura de 4 a 5 días, seguida de una



segunda fase acelerada dependiente a pulsos rápidos de gonadotropinas debido a un feed back positivo a nivel hipotalámico de igual duración que terminará con la ovulación.

Para que un folículo se mantenga dominante necesita la secreción de inhibina por parte de las células de la granulosa, la cual privará la producción de FSH; el mecanismo de compensación por parte del folículo dominante es debido a su número alto de receptores de FSH a comparación de los folículos competidores. Una vez que alcanza la fase de crecimiento rápido el folículo tiene pocos días para recibir suficiente estimulación gonadotrópica o de lo contrario sufrirá atresia folicular y en su lugar aparecerá una cicatriz ovárica (21).

24 horas antes de la ovulación se produce el pico preovulatorio de LH, que cumple funciones como: bloqueo del factor inhibidor del oocito, bloqueo del factor inhibidor de la luteinización, inicio del proceso de luteinización a nivel de la granulosa, disminución en la secreción de estrógenos y aumento en la secreción de progesterona, producción de sustancias de origen granuloso, como relaxina y prostaglandina (PGF α 2), las cuales junto con otras sustancias alterarán la continuidad de las capas tecaes del folículo y llevaran a su desintegración (ovulación) (20).

2.1.6 Funciones, formación y regresión del cuerpo lúteo

Durante muchos años se ha estudiado las principales funciones producidas por el cuerpo lúteo (CL) las cuales son: secreción de hormona esteroidea (progesterona), reducción de los pulsos de liberación de GnRH, preparación a



nivel endometrial para la nidación e implantación e inhibición de las contracciones de la pared uterina durante la gestación (18).

El CL se forma a partir de la rotura de la pared del folículo (ovulación), esta rotura conduce a la degradación de la membrana propia y de las estructuras que rodean la granulosa, además, se libera sangre proveniente de los vasos de la teca hacia el interior de la cavidad, en este momento las células de la granulosa sufren un cambio de secreción de estrógenos a progesterona denominado luteinización que inicia con el pico de LH y se precipita con la ovulación. Además, la LH es la hormona que mantiene al CL tanto en animales gestantes y no gestantes debido a su patrón lento de liberación (un pulso cada 3 horas) (20).

En animales no gestantes la regresión del CL inicia alrededor del día 14 pos ovulación, debido a la síntesis y posterior liberación a través de la vena útero-ovárica de prostaglandina ($PGF2\alpha$) de origen uterino (célula endometrial), la cual provoca cambios como: disminución en la fluidez de las membranas, disminución de antioxidantes en el CL, incremento en la producción de radicales súperóxidos, aumento en la actividad de fosfolipasa y enzimas proteolíticas que llevarán a la regresión funcional caracterizada por la disminución en la síntesis de progesterona, esta regresión es importante para que el animal retorne nuevamente a un estado de fertilidad (22).

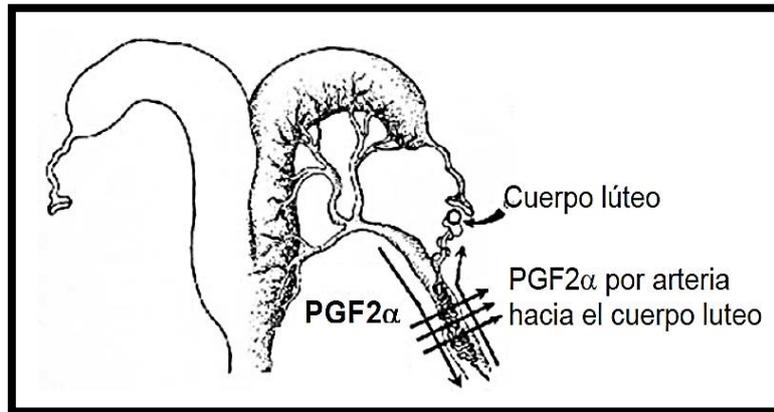


Figura 4: Transporte de la PGF2 α a través de la vena uterina-arteria ovárica (22).

2.1.7 Fases del ciclo estral

Al ciclo estral se lo describe como el tiempo entre dos celos, en la especie bovina este ciclo tiene una duración de 21 días (rango 17-25) que se presenta durante todo el año, por lo cual a la especie bovina se las clasifica como poliestricta continuas, en el cual el animal sufre una serie de cambios fisiológicos, endocrinos, morfológicos y psíquicos. Además, estos cambios ocurren en ciertos días específicos del ciclo por lo que se ha dividido en períodos, designados como: proestro, estro, metaestro y diestro que se describen a continuación (29).

Proestro: Dura de 3 a 4 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación de celo, en el que se da la secreción de limo, con la caída del nivel de progesterona (disminución rápida en el peso del CL), esta disminución inhibe el efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotalámico por el cual el efecto pulsátil de la FSH y LH aparece para estimular el crecimiento folicular.

Estro o celo: Tiene una duración de 2 a 24 horas en el cual abunda el limo claro en forma de red, cuyo olor atrae y excita al toro; además, la hembra permite la



monta del macho y se presentan los signos propios del celo (inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y pérdida del apetito), internamente existe edematización de la vulva, incremento del tono miometral y ablandamiento del canal cervical; este ablandamiento está regulada por acción de la oxitocina y de la progesterona (22). Durante el estro las altas concentraciones de estrógenos inducen el pico preovulatorio de LH (16).

Metaestro: Después de 24 a 30 horas de iniciado el estro se produce la ovulación y la subsiguiente formación del cuerpo lúteo, en la que la hembra rechazara al macho si no es servida a tiempo.

Diestro: Tiene una duración de 15 a 18 días en la que predomina el cuerpo lúteo por acción de la LH en su mantenimiento y desarrollo, además, el útero se preparará para recibir al embrión y en caso de no presentarse la preñez se reinicia el ciclo (30).

En resumen, durante el ciclo estral bovino, los ovarios sintetizan y secretan estrógenos (E_2) y progesterona (P_4), entre otros productos; estos regulan la función del sistema reproductivo por lo cual se puede dividir al ciclo estral en dos fases: la fase folicular y la fase luteal. La fase folicular o estrogénica se caracteriza por que existe el desarrollo de un folículo pre ovulatorio y la secreción de estrógenos por parte del folículo. El estrógeno secretado ejercerá un feed back positivo sobre la adenohipófisis estimulando la secreción de FSH y de LH, todo esto para completar el desarrollo del folículo preovulatorio y maduración final con la consiguiente ovulación del mismo; Por otra parte, la fase luteal se caracteriza por la secreción de progesterona, la cual es producida por el CL que

fue formado tras la ovulación del folículo pre ovulatorio, esta fase luteal llegará a su término entre los días 15 a 17 del ciclo, si la vaca no quedo preñada se iniciará la regresión del cuerpo lúteo por acción de las prostaglandinas, lo cual contribuirá a el inicio de un nuevo folículo preovulatorio (31).

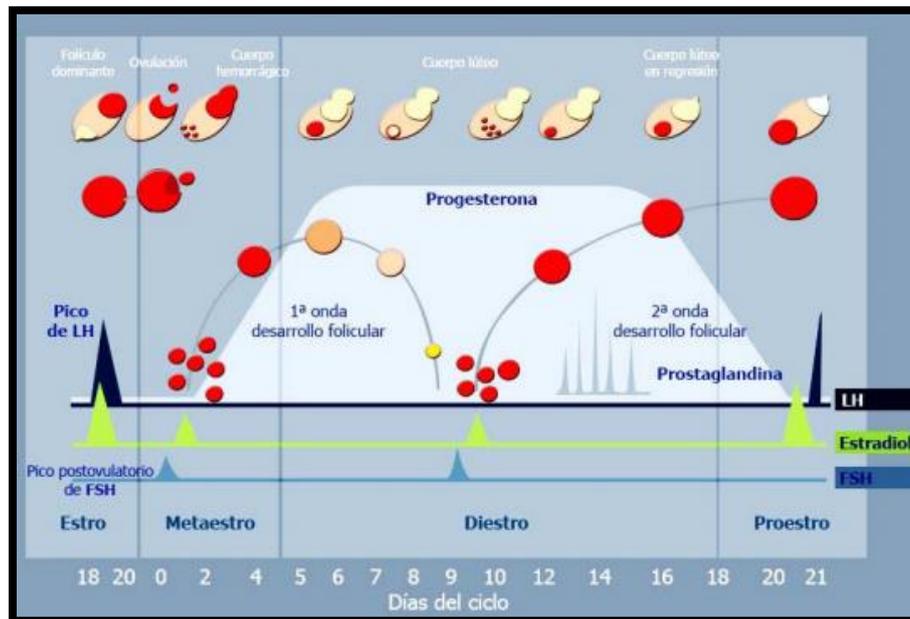


Figura 5: Fases del ciclo estral bovino (32).

2.1.8 Dinámica folicular

La dinámica folicular es el proceso de crecimiento y regresión de los folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio (31). El ciclo estral del ganado bovino está compuesto por dos, tres y hasta cuatro ondas foliculares, la primera onda se presenta el día de la ovulación (día 0), que consiste en una cohorte de folículos antrales entre 3 y 6 mm de diámetro, de los cuales solo uno será el dominante mientras que el resto se volverán subordinados y sufrirán atresia, la segunda onda se presenta al día 10 en vacas



de dos ondas y entre los 8 a 9 en vacas de tres ondas y en aquellas vacas de tres ondas esta se presentara al día 15 o 16 (33).

Goodman y Hodgen (1983), propusieron que para describir el desarrollo de los folículos antrales se deben presentar dentro una onda folicular las fases de reclutamiento, selección, dominancia. Sin embargo, a la fecha se conoce que una onda de crecimiento folicular está compuesta de cuatro etapas: reclutamiento, selección, desviación y dominancia (31).

1. **Reclutamiento:** Engloba el desarrollo de una cohorte o grupo de folículos que comienzan a madurar bajo un aporte dependiente de gonadotropinas, se admite que un folículo antral se encuentra en reclutamiento cuando tiene un diámetro de 2 a 4 mm y después de varios días (2 a 4 días) llegara a 6 a 9 mm.
2. **Selección:** En este punto un folículo es elegido para llegar a ser dominante y este inhibirá el crecimiento del resto de los folículos (atresia), situación que se atribuye a la disminución de la FSH por parte del folículo dominante (22).
3. **Desviación:** Esta ocurre cuando se inicia la diferencia en el crecimiento de los dos folículos más grandes de una cohorte. Es a partir de este momento que el FD y el primer folículo subordinado divergen gradualmente en diámetro.
4. **Dominancia:** El folículo dominante alcanza un diámetro de 10mm (31) y genera un efecto de inhibición para que no se forme una nueva cohorte de folículos, con la ovulación o atresia de este folículo se genera un

segundo pico de FSH que ocurrirá luego de la ovulación permitiendo así el inicio de una nueva onda folicular (16).

5. **Atresia:** Se presentará solo en aquellos folículos no ovulatorios (22).

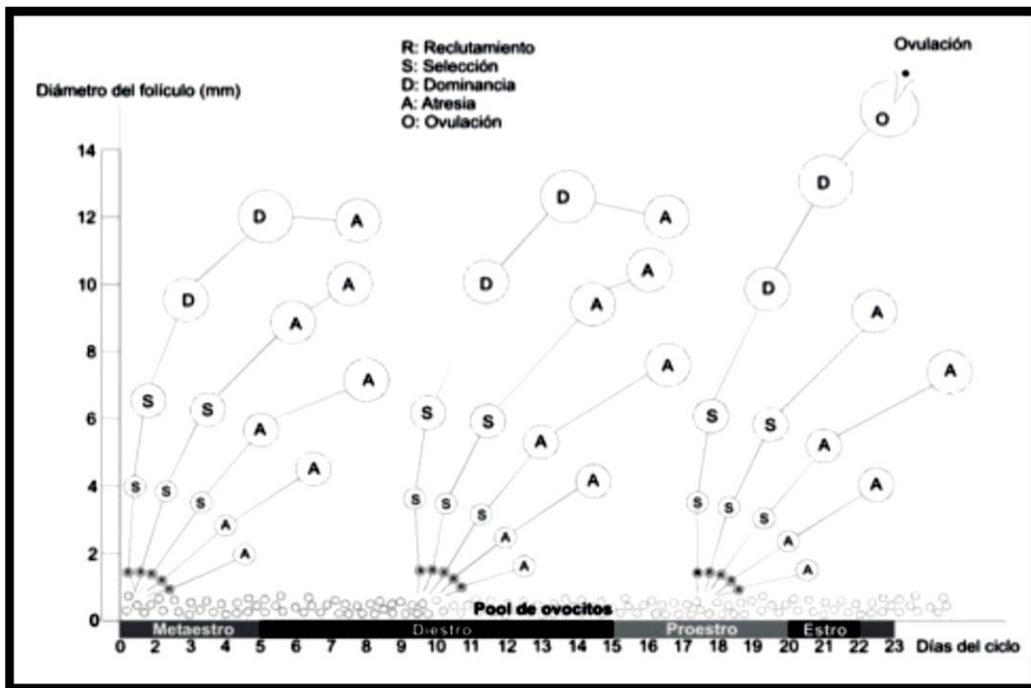


Figura 6: Esquema representativo de la dinámica folicular durante el ciclo estral bovino (34).

2.2 ASPIRACION FOLICULAR TRANSVAGINAL (OPU)

En la actualidad la recuperación de ovocitos provenientes de una hembra viva a través de la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía y su posterior maduración, fecundación y cultivo permiten producir embriones que pueden ser crío preservados o bien transferidos a una hembra receptora (35).



La técnica de OPU (Ovum pick-up), fue utilizada en primera instancia para la reproducción asistida en humanos y aplicada en el ganado bovino por primera vez en el año de 1988 como una solución alternativa a las técnicas de aspiración folicular mediante laparotomía y laparoscopia (36).

En vacas donantes de ovocitos para cultivo y producción in vitro de embriones resulta muy trabajosa la manipulación transrectal del ovario por la visualización indirecta ya sea por ecografía o laparoscopia, siendo mucho más fácil en ovarios de matadero, debido a que el operador puede examinarlos y puncionarlos directamente (22).

Esta técnica permite recolectar ovocitos inmaduros provenientes de una vaca viva mediante aspiración guiada mediante ultrasonografía. Además, permite utilizar vacas adultas que presenten diversos estados fisiológicos como: cíclicas, acíclicas, primer tercio de gestación, vacas que no respondan a la estimulación hormonal y en animales viejos con problemas reproductivos de origen no genético.

Para realizar la técnica de OPU se necesita: un equipo de ultrasonografía, un transductor sectorial de 5-7.5MHz, una bomba de aspiración y un sistema guía de aguja compuesto por un mango de OPU de 60 cm, una aguja de punción desechable que se encuentra conectada a un tubo estéril de 50 ml. Todo esto se encuentra conectado a una bomba de vacío de fuerza constante accionada por pedal (36).



2.2.1 Procedimiento para OPU

El procedimiento para OPU se puede separar en dos partes importantes que pueden ser resumidas de la siguiente forma:

2.2.1.1 A nivel de Campo.

1. Una vez seleccionadas las vacas donantes de ovocitos se las introducirá en un potro de contención, seguida de la aplicación de xilacina al 2% (0,02mg/kg) o detomidina.
2. Continúo a esto, se realiza el vaciamiento del contenido rectal y lavado de la región perineal.
3. Minutos más tarde se procede a la administración de lidocaína al 2% (0,4mg/kg) via epidural, esto para reducir los esfuerzos de expulsión y así facilitar la manipulación, seguido a esto se realiza la limpieza y desinfección exhaustiva de la región perineal (36).
4. Se introduce el transductor por via vaginal hasta posicionarse a cualquier lado del cérvix (según ovario a puncionar).
5. Además, se introduce la mano izquierda por via rectal para fijar el ovario a la cabeza del transductor hasta ser visualizado en pantalla.
6. Seguido a este movimiento se ingresa la guía de punción siguiendo su trayectoria en pantalla. (8).
7. Una vez ubicado el folículo se empuja suavemente la aguja hasta que penetre la pared vaginal y luego la folicular; una vez conseguido esto se presiona el pedal de la bomba de succión para que este aspire su contenido y lo deposite en un recipiente junto a un medio de aspiración atemperado (PBS+ heparina 2'2 UI/ml y suero fetal bovino 1%) (22).



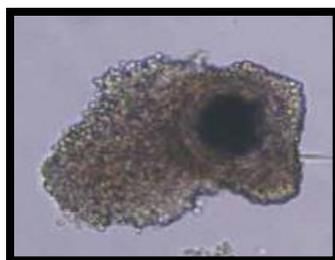
2.2.1.2 A nivel de Laboratorio

El material obtenido será llevado al laboratorio en un tubo falcón de 50 ml e inmediatamente será filtrado, los residuos de sangre serán eliminados por lavados continuos en medio de recolección (PBS) atemperado y se pasará a una placa Petri para su localización y evaluación morfológica mediante estereomicroscopia (36).

Para la clasificación morfológica de los COC's se toma en cuenta el aspecto del citoplasma y el número de capas que constituyen el cumulus. Un citoplasma homogéneo y oscuro es un indicativo de un desarrollo óptimo y un cumulus formado por varias capas de células compactas nos representa un mayor porcentaje de viabilidad en cuanto a maduración, fecundación y desarrollo hasta blastocistos, siendo de otra manera en aquellos que carecen de cumulus.

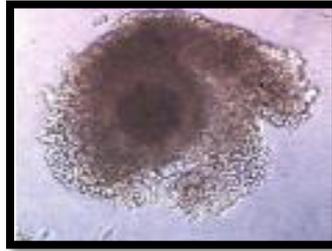
Morfológicamente se clasifican en:

Tipo A o Categoría I: Ovocito con más de cuatro capas, cumulus compacto, citoplasma homogéneo e uniformemente granulado.



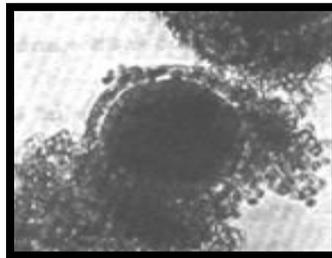
Fotografía 1: Ovocito categoría I (36).

Tipo B o Categoría II: Ovocitos con menos de tres en su cumulo, citoplasma homogéneo.



Fotografía 2: Ovocito categoría II (37).

Tipo C o Categoría III: Ovocitos con mono capa de células del cumulus y citoplasma de apariencia irregular con áreas oscuras.



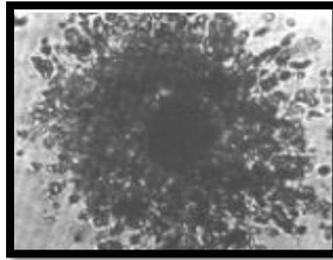
Fotografía 3: Ovocito categoría III (38).

Tipo D o Categoría IV: Ovocito desnudo.



Fotografía 4: Ovocito categoría IV (37).

Tipo E o Categoría V: Ovocitos maduro con células del cumulus expandido (36).



Fotografía 5: Ovocito categoría V (38).

Los ovocitos tipo A y B que llegan a ser fertilizados mediante FIV y consiguen dividirse (80% los A y 77 % los B), llegando a blastocistos (40% de los A y 20% de los B). En cuanto a los tipos C y D consiguen dividirse (40% los C y 34% los D), no pudiendo alcanzar su desarrollo hasta blastocisto (37).

2.2.2 Ventajas de OPU

OPU permite optimizar la utilización del semen, ya que en un día podemos fecundar ovocitos recogidos de donantes diferentes con una sola dosis de semen. Con la ventaja de que los ovocitos de una sola donante pueden ser fecundados por diferentes toros en una sola sesión de aspiración, permitiéndonos así una variabilidad en cuanto a genética. Además, permite incrementar tasas de fecundación mediante el uso de semen sexado debido a que se reduce el número de espermatozoides que será necesario para fecundar los ovocitos. Asimismo, permite trabajar hembras con problemas reproductivos como infertilidad, repetidoras, afecciones del tracto reproductivo o con respuesta negativa a tratamientos hormonales (8).

Además, se puede utilizar donantes a intervalos más cortos comparando con la técnica de superovulación y ovarios de matadero. Se pueden realizar hasta 2



punciones por semana lo que nos permitirá obtener en promedio de 4,1 ovocitos/vaca/sesión, pudiendo alcanzar un promedio de 10,4 ovocitos/vaca/sesión en caso de previa utilización de FSH y bST, lo que nos permitirá obtener entre 50 (sin estimulación hormonal) y 100 (con estimulación hormonal) crías al año por vaca donante. Lo que representa 3 a 4 veces más los valores logrados mediante transferencia de embriones.

Es de alta importancia recalcar que la técnica de OPU no solamente está restringida a bovinos ya que ha sido aplicada en otras especies como lo son: equinos, rumiantes silvestres y búfalos, permitiendo recuperar especies en peligro de extinción (8).

La recolección de ovocitos provenientes de un animal vivo y que son sometidos a un procedimiento de producción in vitro permiten aumentar de forma significativa la cantidad de embriones viables y de terneros vaca-año. Asimismo, permite disminuir los intervalos generacionales lo cual ayuda a incrementar la eficiencia productiva del hato. La aspiración folicular (OPU) puede ser repetida en el mismo animal dos veces por semana durante 5 a 6 meses, sin afectar negativamente sobre el bienestar animal y la reproducción. Además, OPU puede ser aplicada durante el primer tercio de gestación en novillas o vacas y a novillonas pre púberes con lo que se consigue acortar el intervalo generacional.

Por otra parte; el cultivo y la producción in vitro de embriones permite obtener embriones de hembras con infértiles o con nula o mala respuesta a los tratamientos superovulatorios. Investigaciones han demostrado que en la última etapa del periodo de aspiraciones los animales pueden retornar a sus ciclos



estrales normales y ser nuevamente incorporados a sus programas de cría. La posibilidad de los embriones para culminar su desarrollo a partir de los ovocitos obtenidos por aspiración es similar a la alcanzada por embriones producidos por otros procedimientos in vitro, pero más bajas tasas de embriones obtenidos por lavado en el cual sus porcentajes de preñez varían entre un 25-45 % (38).

El éxito de la punción folicular transvaginal se puede dividir en 2 categorías:

Aspectos técnicos: aspiración, tipo y diámetro de aguja, presión de aspirado y bisel de la aguja.

Aspectos biológicos: experiencia del operador, tiempo y frecuencia de OPU, pre estimulación hormonal, edad, animal donante y estado fisiológico de la donante (22).

- **Animal donante:** Cada animal donante presenta variaciones en cuanto a su eficiencia y número de ovocitos obtenidos presentando hasta un 20% de variación en los tratamientos de OPU.
- **Experiencia del operador:** La experiencia del operador tiene un efecto significativo en el número y la calidad de ovocitos recolectados.
- **Pre estimulación:** La mejora más relevante con respecto a la calidad de los ovocitos y, por consiguiente, producción de embriones fue la pre-estimulación hormonal mediante el uso de gonadotropinas.
- **Frecuencia de OPU:** Investigaciones han llegado a la conclusión que el periodo de tiempo entre dos sesiones de OPU afectan de forma negativa en la producción de ovocitos sobre todo en la cantidad y calidad de los mismos (36).



2.3 BRILLANTE DE CRESILO

Durante varios años se ha visto la necesidad de buscar métodos no perturbadores e invasivos para la selección de ovocitos más homogéneos y competentes, lo cual puede ser realizado por métodos directos e indirectos, uno de los métodos indirectos es mediante la tinción vital azul brillante de cresilo (BCB), este es un colorante vital que permite determinar la actividad intracelular de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), esta es una enzima sintetizada durante la fase de crecimiento ovocitario, pero con actividad nula o disminuida en ovocitos que han terminado su crecimiento. La condición de ser retenedor o no depende de la actividad de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, esta enzima reduce el cresilo volviéndolo un compuesto incoloro. En particular, esta enzima cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato y es la reacción limitante de esta, es decir la funcionalidad de la vía depende de la actividad de esta enzima. En ovocitos la vía de las pentosas fosfato está activa cuando hay procesos de biosíntesis y crecimiento celular, deprimiéndose su actividad cuando el ovocito termina su fase del crecimiento (39). Así los ovocitos que mantienen su citoplasma azul tras ser cultivados con BCB son aquellos que terminaron su fase de crecimiento y están aptos para seguir la maduración; Además, aquellos ovocitos seleccionados como positivos a la prueba tienen mayores diámetros y mejor calidad morfológica que su contraparte negativa a la prueba. También, se ha determinado que los ovocitos con mayor afinidad por el BCB, previo a la maduración, presentan una mayor capacidad de progresión meiótica, una mayor expresión del factor promotor de la maduración y mayor actividad mitocondrial (40).



3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Materiales biológicos

- Hormonas
 - FSH-LH (Pluset®)
 - GnRH
- Vaquillas

3.1.2 Materiales de campo

- Jeringas de 3-5-10 y 20 ml.
- Guantes Nitrilo
- Guantes de chequeo ginecológico
- Sogas
- Recipientes
- Toallas desechables
- Sustancias Jabonosas
- Agujas Desechables 18 G
- Tubos Falcón
- Equipo de ultrasonido Aloka SSD ProSound2®
- Transductor sectorial
- Porta sonda de ultrasonido
- Bomba de Aspiración
- Sistema de Guía de Aguja con aguja larga desechable 20 G
- Set de mangueras



3.1.3 Materiales de laboratorio

- Micropipetas de desplazamiento positivo
- Capilares de vidrio para micropipetas
- Pipetas automáticas
- Puntas de pipetas automáticas
- Placas petri cuadrículadas
- Pacas bi petri
- Placa con pocillos múltiples para cultivo celular
- Cámara de CO₂
- Estéreo microscopio
- Filtro EMCON
- Jeringas sin embolo de goma
- Baño María
- Platina de calefacción

3.1.4 Materiales químicos

- Gel
- Alcohol 70%
- Medio de recolección (PBS)
- Lidocaína
- Xilacina
- Azul brillante de Cresilo
- HSOF
- Heparina

3.2 METODOS

3.2.1 Área de estudio

MAPA

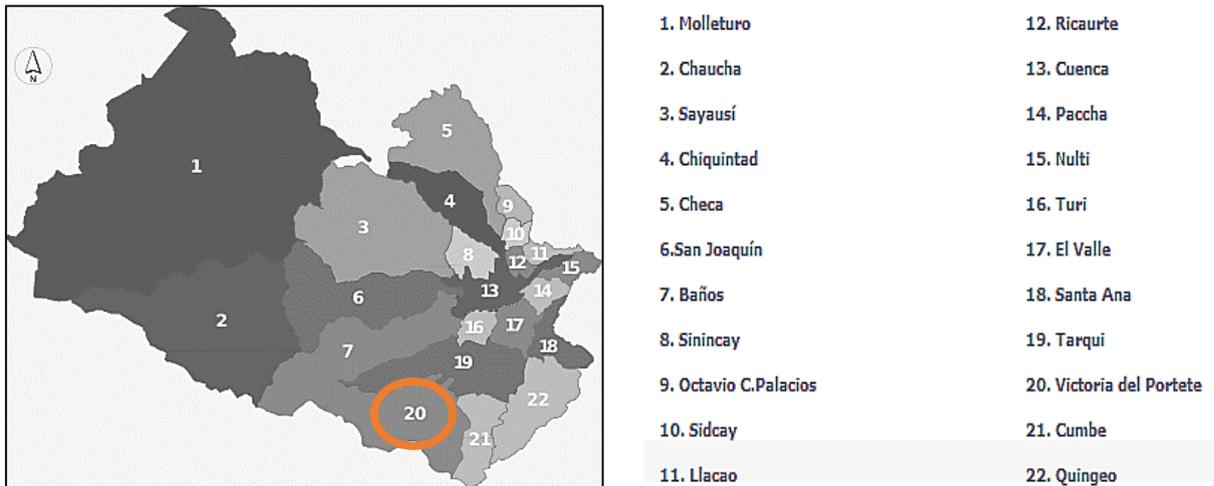


Figura 7: División Política Territorial del Cantón Cuenca, parroquia, Victoria Del Portete. **FUENTE:** Alcaldía De Cuenca (2014).

Ubicación Política-Geográfica y Aspectos Ecológicos

La Granja Experimental de Irquis tiene una extensión de 507,8 ha y 2.897 m² en construcciones. Se encuentra en el Cantón Cuenca, Parroquia Victoria del Portete a una altitud de 2.671 m.s.n.m.; La precipitación promedio anual es de 1.078,05 milímetros (mm) y temperaturas que oscilan entre 7 y 12 ° C.

3.2.2 Metodología para la Investigación Experimental (campo)

Unidad experimental

Se utilizaron dos vaquillas Criollas como donadoras de ovocitos, las cuales tenían una edad entre 2 a 3 años, una condición corporal de 2 a 3 escala del 1



al 5 (41), que estaban en buen estado de salud y no tenían alteraciones reproductivas aparentes.

Sesiones de OPU

Se realizaron 22 sesiones de OPU, cinco en el tratamiento OPU 40h y OPU 48h; y seis en testigo 40h y testigo 48h. Las maniobras fueron realizadas a las 09:00 a.m. una vez por semana de acuerdo al cronograma establecido (**anexo 4**).

Valoración pre-ensayo de las vaconas previo a la investigación.

Una semana antes de la investigación se realizó un monitoreo ecográfico de las vaquillas con el fin de comprobar la ciclicidad mediante la presencia de cuerpo lúteo.

Tratamientos realizados

Tratamiento 1: Se siguió el protocolo de estimulación hormonal descrito por Ruiz *et al.*, (13), quienes propusieron la eliminación del folículo dominante mediante la administración de GnRH (Conceptal®) a dosis de 0,2 mg por vía IM, al día 0, seguido 48 horas más tarde por la aplicación de 500 U.I de FSH-LH (Pluset®) (**anexo 2**) IM (Día 2). Las sesiones de OPU se llevaron a cabo a las 40 horas post aplicación de la hormona Pluset®.

Tratamiento 2: Este protocolo de estimulación hormonal fue semejante a T1, con la diferencia, que las sesiones de OPU se produjeron 48 horas después de la aplicación de FSH-LH (Pluset®).



Tratamiento 3: (testigo 40h); Las vaquillas de este tratamiento recibieron el mismo protocolo del tratamiento 1 pero sin la aplicación de hormona para la estimulación ovárica.

Tratamiento 4: (testigo 48h); Protocolo similar a T2, pero sin la aplicación de la hormona estimuladora.

Para facilitar el procedimiento de OPU, las vaquillas fueron inmovilizadas en un brete y tranquilizadas con Xilacina 2% (Dormi-Xyl[®]2) a una dosis de 0,02 mg/kg IM, que fue seguido del vaciamiento del contenido rectal (**anexo 7**) y posterior aplicación de lidocaína 2% (Roxicaina[®] 2%) por vía epidural a una dosis de 0,3 mg/Kg. Para la valoración de los folículos ováricos se utilizó un ecógrafo Aloka ProSound2[®], equipado con un transductor sectorial de 5 MHz. Este último fue ensamblado en un soporte para sonda que contenía la guía, además, la guía de punción conformada por una aguja desechable (1,2x75mm) conectada a una bomba de vacío con una presión de aspiración de 70 mmHg.

Una vez que el equipo de OPU fue preparado (**anexo 1**) y configurado, se ingresó vía vaginal y se contaron los folículos >5 y <8mm y luego se aspiraron. El número y tamaño de los folículos fueron registrados en el libro de campo (**anexo 5 y 6**). El medio de recolección de ovocitos fue PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, P-4417) suplementado con heparina (2,2 U. l/ml) atemperado a 37°C

3.2.3 Metodología para la Investigación Experimental (laboratorio)

El material obtenido fue inmediatamente llevado al laboratorio en un tubo falcón de 50 ml donde se procedió a filtrar el contenido del tubo con un filtro EMCON.



El material filtrado luego se transfirió a una placa Petri cuadrículada de 95mm y mediante un estereoscopio (**anexo 8**) se identificaron y clasificaron morfológicamente los ovocitos recuperados según el criterio de evaluación indicado por Le Guienne (42) que se describen a continuación:

- Calidad (A): COC con un citoplasma homogéneo y un cumulus oophorus completo.
- Calidad (B): COC con un cumulus oophorus incompleto pero compacto con más de cinco capas y un citoplasma homogéneo.
- Calidad (C): COC con citoplasma heterogéneo y más de tres capas de células cumulus o más de cinco capas en algunas partes.
- Calidad (D): COC con cumulus oophorus parcial o totalmente ausente y citoplasma fuertemente heterogéneo.

Una vez que fueron clasificados y contabilizados se procedió a la evaluación de su viabilidad y actividad enzimática mediante la tinción vital Azul brillante de Cresilo.

Para esto; una hora antes de evaluar la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se procedió a calibrar la cámara de CO₂ a una temperatura de 38.5 °C, humedad del 90% y CO₂ a 5%.

Para evaluar la actividad de la enzima se utilizó la tinción Azul brillante de Cresilo; Los ovocitos (A, B, C y D) fueron teñidos en gotas de 25 µm separados por clase y por vaquilla, posterior a esto se ingresó a la cámara de CO₂ por un



tiempo de 90 minutos, después se realizó tres lavados de las gametas mediante la técnica de lavado en gotas y su evaluación mediante estereomicroscopia siguiendo el fundamento de ovocitos que han teñido sus citoplasmas como positivos (terminaron su crecimiento) y los que no han teñido su citoplasma como negativos (continúan su crecimiento).

3.2.4 Análisis Estadístico

La investigación fue de tipo experimental, tuvo cuatro tratamientos y cinco repeticiones.

Se analizaron 330 datos en total y 15 variables; Para el análisis de los datos, se utilizó un modelo lineal general a través del PROC GLM en el SAS vw 9.3 (Statistical Analysis System, 2013). Las diferencias entre medias se compararon mediante la prueba de Tukey-Kramer. El diseño utilizado correspondió a un diseño de medias repetidas según se describe a continuación:

Modelo utilizado: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$

Dónde:

Y_{ij} = Observaciones

μ = efecto de una media general

T_i = efecto fijo del i ésimo tratamiento ($i=1, 2, 3$ y 4)

e_{ij} = error aleatorio, debido a cada observación $NID \sim (0, s^2e)$.



El análisis de resultados se valoró entre los cuatro tratamientos en una primera instancia y luego agrupados en aptos (calidad A+B) y no aptos (calidad C+D) para PIV de acuerdo a su calidad.

3.2.5 Variables de estudio

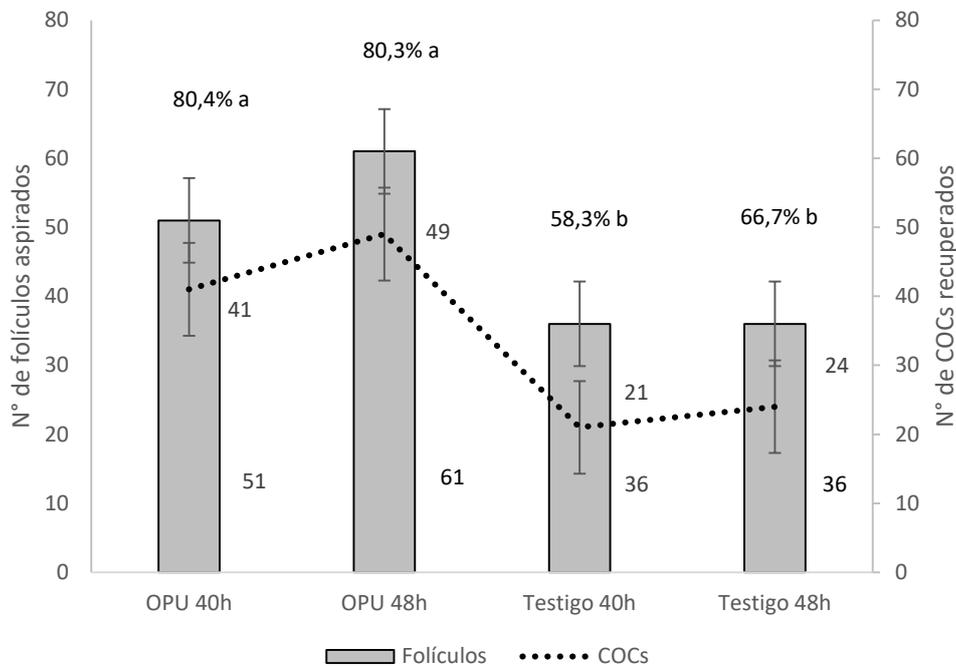
- **Variable Independiente:** Tratamiento, el animal y el día de colección de ovocitos.
- **Variabes Dependientes:** El número de folículos en los ovarios, el número de ovocitos recuperados, el número de ovocitos de clase A, B, C y D, y el número de ovocitos de clase A, B, C y D que reaccionaron positivamente al Azul Brillante de Cresilo (**anexo 3**).



4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Numero de folículos visualizados y COC's recuperados

Se aspiraron un total de 51 folículos en el tratamiento OPU 40h, con un porcentaje de recuperación del 80,4%; en OPU 48h se aspiró 61 folículos, con una recuperación del 80,3%; en el testigo 40h se aspiraron 36 folículos y se recuperó un 58,3% y en el testigo 48h un total de 36 folículos fueron aspirados con una recuperación del 66,7%, **figura 8**.



Valores con letras diferentes indican grupos diferentes entre tratamientos; prueba de Tukey-Kramer. ($P < 0,05$)

Figura 8: Folículos visualizados, COC's recuperados con su respectivo porcentaje en cada tratamiento



Al evaluar las sesiones de OPU, se observó que las vaquillas estimuladas con Pluset® (FSH-LH) tratamientos OPU 40h (80,4%) y OPU 48h (80,3%), no presentaron diferencias significativas ($P>0,05$) entre sí, respecto a COC's recuperados. Iguales comportamientos presentaron los tratamientos no estimulados testigo 40h (58,3%) y testigo 48h (66,7%). Sin embargo, al comparar el número de folículos visualizados y COC's recuperados de los tratamientos con estimulación ovárica (OPU 40h y OPU 48h) frente a los que no recibieron estimulación (testigo 40h y testigo 48h), se determinó diferencia estadística ($P<0.05$), **tabla 1**.

Sakhong *et al.*, (43) indicaron que existe diferencia en el comportamiento de la dinámica folicular y la respuesta a la estimulación ovárica entre razas. Por lo tanto, los datos obtenidos en razas *Bos taurus* no pueden ser extrapolados a animales *Bos indicus* (5). Sin embargo, al ser uno de los primeros estudios que se realiza en vaquillas de genotipo Criollo ecuatoriano, animal de tendencia lechera, se intentará analizar con trabajos realizados en bovinos Criollos de otras regiones y *Bos taurus* principalmente.

Los porcentajes de recuperación de COC's en la presente investigación son similares a los obtenidos por autores como Chasombat *et al.*, (5) y de Roover *et al.*, (44) 80,83% y 79% respectivamente en sus trabajos realizados en vaquillas Criollas tailandesas y animales de carne Belgian Blue, quienes utilizaron FSH en dosis de 100mg en el primer estudio y 160µg de FSH y 40µg de LH por sesión en el segundo trabajo. Otros investigadores como Chaubal *et al.*, (12) encontraron porcentajes de recuperación de COC's por debajo de los valores obtenidos (66,3%) en este estudio, al aplicar una dosis de 200mg de FSH.



Similares resultados obtuvieron Garcia *et al.*, (45) (63,3%) y Ruiz *et al.*, (13) (56,7%), al aplicar una dosis de 500 UI de FSH-LH en los dos casos.

El alto porcentaje de recuperación COC's en la presente investigación denota la eficiencia de la técnica alcanzada en la OPU; sin embargo, Pieterse *et al.*, (7); Roover *et al.*, (10) y Torres *et al.*, (46) indican que las diferencias en los promedios podrían ser explicados por el protocolo de estimulación utilizado, la raza, sin excluir la experiencia del operador y el sistema de manejo de los animales utilizados.

Tabla 1: Media y error estándar del número de los folículos visualizados y COC's recuperados por OPU en cada uno de los tratamientos.

Tratamientos	Folículos visualizados	COC's recuperados
OPU 40h	10.2± 0.94 ^a	8.2± 0.71 ^a
OPU 48h	12.2± 0.94 ^a	9.8± 0.71 ^a
Testigo 40h	5.6± 0.94 ^b	3.6± 0.71 ^b
Testigo 48h	5.4± 0.94 ^b	3.0± 0.71 ^b

Leyenda: letras diferentes en la misma columna tienen diferencia ($P < 0,05$), (Tukey-Kramer, 1956).

Los resultados obtenidos demuestran que la estimulación ovárica con FSH-LH permite recuperar tres veces más COC's con respecto a los tratamientos que no recibieron FHS-LH (**tabla 1**). El resultado obtenido concuerda con Roover *et al.*, (10), quienes señalan que un animal estimulado hormonalmente antes de OPU aumenta significativamente la producción de folículos perforados y COC's recuperados con respecto a aquellos animales que no recibieron estimulación. Otros autores como Blondin *et al.*, (11); Chaubal *et al.*, (12); Roover *et al.*, (44); García *et al.*, (45); Chasombat *et al.*, (5) y Ruíz *et al.*, (13) atribuyen el incremento del número de folículos antrales y preovulatorios en animales estimulados a la



acción de la FSH que, además de intervenir en el proceso de esteroideogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular, ayuda a los folículos subordinados a escapar de la atresia durante la etapa de desviación folicular.

Por otra parte, Roover *et al.*, (44) obtuvieron valores similares al del presente estudio en la relación entre folículos visualizados y COC's recuperados en vacas sin estimulación ovárica ($7,1 \pm 3,9$ y $4,1 \pm 3,1$ respectivamente). Sin embargo, en los tratamientos con estimulación ovárica los folículos visualizados ($14,9 \pm 9,9$) y COC's recuperados ($11,8 \pm 8,2$) fueron mayores a los de la presente investigación. Uno de los aspectos que pudiera explicar en esta diferencia es la utilización de implantes de progesterona (3 mg de norgestomet) previo al protocolo de estimulación, lo cual no fue incluido en el protocolo de estimulación ovárica utilizado en el presente estudio. Asimismo, Chaubal *et al.*, (12) observaron tendencias similares de los folículos visualizados ($7,8 \pm 2,4$) y COC's recuperados ($4,6 \pm 1,9$) en los tratamientos sin estimulación ovárica, pero luego de la estimulación estos autores detectaron más folículos en los ovarios ($16,0 \pm 5,0$) y recuperaron más COC's ($10,6 \pm 4,5$) que en este estudio. Esta discrepancia pudo deberse a dos factores; (1) la técnica de sincronización de la onda realizada previo a la estimulación ovárica, con la cual eliminaron el folículo dominante antes del OPU y (2) la utilización de vías de diferentes de administración (IM y SC) de la hormona (FSH).

Lo anteriormente indicado es corroborado por Garcia & Salaheddine (47), quienes demostraron que la ablación del folículo dominante suprime el efecto de retroalimentación negativa del 17β -estradiol e inhibina producidos por los folículos en crecimiento sobre la FSH endógena, y sincroniza la emergencia de



una nueva onda folicular, aproximadamente 2 días más tarde, cuyos folículos crecen en respuesta a un nuevo incremento de FSH. Además, según Chaubal *et al.*, (12) la utilización de dos vías de administración de la hormona antes de OPU, tiene como finalidad proporcionar una estimulación ovárica rápida, mediante vía intramuscular, y una fuente sostenida de FSH, a través de la vía subcutánea.

4.2 Calidad de los ovocitos

Al comparar la calidad de los complejos cumulo ovocitos (COC's) recuperados por OPU en dos momentos diferentes (40h y 48h) luego de la aplicación de la hormona (FSH-LH), se obtuvo una mayor cantidad de COC's de calidad A cuando la OPU se realizó a las 48h ($3,4 \pm 0,45$), que cuando se llevó a cabo a las 40h ($1,4 \pm 0,45$), es decir, en OPU 48h se obtuvieron 2,4 veces más ovocitos de clase A que en OPU 40h ($P < 0,05$), valor que a su vez fue casi 7 veces mayor que el obtenido por el grupo testigo OPU 48h. Resultados similares fueron obtenidos por Blondin *et al.*, (48) en su investigación, donde los COC's fueron recogidos mediante OPU en dos momentos diferentes (33 y 48h) luego de aplicarse la hormona. Estos autores determinaron que la realización del OPU a las 48h post aplicación de la hormona (en este caso se usó Folltropin®) a dosis de 25mg, que permitió a los ovocitos completar la maduración citoplasmática y hacerse competentes para su desarrollo posterior.

Además, Blondin *et al.*, (49) atribuyeron que el tiempo entre la última aplicación de FSH y la sesión de OPU incremento el incremento de los folículos medianos a grandes, lo cual indujo una ligera atresia en las células foliculares y que permitió una mejor competencia de los ovocitos obtenidos. Lo indicado anteriormente es aceptado por Vassena *et al.*, (50) y Adams *et al.*, (51) quienes



además, explicaron que una mayor duración del ovocito en el ambiente folicular permite almacenar ARNm y proteínas moleculares claves para potenciar su capacidad de desarrollo, lo cual no sucede con los ovocitos recuperados prematuramente y que probablemente carecen de la maquinaria transcripcional necesaria para su desarrollo.

La cantidad de COC's de calidad B recuperados entre los grupos tratados con hormona fue estadísticamente similar ($P>0,05$), **tabla 2**. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos entre los tratamientos que recibieron estimulación ovárica OPU 40h ($3,2\pm 0,81$) y OPU 48h ($3,0\pm 0,81$), frente a los que no recibieron FSH-LH testigo 40h ($0,8\pm 0,81$) y testigo 48h ($0,4\pm 0,81$), se pudo comprobar que se obtuvieron alrededor de tres veces más COC's en los primeros que en los segundos ($P<0,05$).

El número de COC's calidad C fue estadísticamente similar entre grupos experimentales ($P>0,05$). En cuanto a los COC's de calidad D, aunque los COC's recuperados de las vaquillas tratadas hormonalmente fueron considerablemente mayores que los obtenidos de los testigos, únicamente las del grupo OPU 48h fueron estadísticamente diferentes a las de ambos grupos testigos ($P>0,05$) **tabla 2**. Este comportamiento Bó *et al.*, (52) atribuyen a una dosis insuficiente de hormona que no logra saturar los receptores de FSH y LH; Además, Martínez *et al.*, (53) sugieren que la administración de GnRH al inicio del protocolo puede influenciar en el grado de desarrollo del folículo dominante, que provoca asincronía en el inicio y desarrollo de la onda folicular.



Tabla 2: Número de COC's recuperados de acuerdo al tratamiento de estimulación ovárica y de la calidad ovocitaria (Media \pm error estándar).

Tratamientos	Calidad de los ovocitos					
	A	B	A+B	C	D	C+D
OPU 40h	1.4 \pm 0.45 ^b	3.2 \pm 0.81 ^a	4.6 \pm 0.93 ^a	2.2 \pm 0.64	1.4 \pm 0.44 ^{ab}	3.6 \pm 0.83
OPU 48h	3.4 \pm 0.45 ^a	3.0 \pm 0.81 ^a	6.4 \pm 0.93 ^a	1.6 \pm 0.64	1.8 \pm 0.44 ^a	3.4 \pm 0.83
Testigo 40h	0.4 \pm 0.45 ^c	0.8 \pm 0.81 ^b	1.2 \pm 0.85 ^c	1.8 \pm 0.64	0.5 \pm 0.40 ^b	2.3 \pm 0.76
Testigo 48h	0.2 \pm 0.45 ^c	0.4 \pm 0.81 ^b	0.6 \pm 0.85 ^c	2.0 \pm 0.64	0.5 \pm 0.40 ^b	2.5 \pm 0.76

Leyenda: letras diferentes en la misma columna tienen diferencia ($P < 0,05$), (Tukey-Kramer, 1956).

Garcia *et al.*, (45) clasificaron en su estudio a los COC's recuperados como aptos para PIV a los que tenían calidad I, II y III, y no aptos a los COC's pertenecientes a las calidades IV y V. Con la finalidad de homogenizar criterios de valoración, en la presente investigación se clasificaron los COC's de calidad A y B como aptos, y los de C y D como no aptos para la PIV. Por lo tanto, a continuación, describimos los resultados de los COC's recuperados de los 4 tratamientos y agrupados en aptos (A y B) y no aptos (C y D).

El 65,3 % de los COC's recuperados del tratamiento OPU 48h fueron clasificados como aptos para PIV (A+B), este valor es superior al establecido por Garcia *et al.*, (45) (50,46%). Se considera que esta diferencia puede estar asociada a la estrategia de agrupamiento de los COC's.

En el tratamiento OPU 40h no se encontró diferencia ($P > 0,05$) entre el porcentaje de COC's considerados aptos (56,1%) y no aptos (43,9%). Sin embargo, al comparar tratamiento 1 (OPU 40h) y T2 (OPU 48h) se observó un incremento



del 16,37% de COC's aptos recuperados. Los tratamientos testigos no mostraron diferencia estadística ($P>0,05$).

Al valorar los COC's aptos (A+B) recuperados en los tratamientos que recibieron estimulación (OPU 40h; OPU 48h), se pudo observar un incremento del 59,4% de COC's (aptos) frente a los tratamientos testigos (40h;48h). Esto concuerda con Restrepo *et al.*, (6) quienes describieron que la utilización de FSH y LH juntas no solo permitió el reclutamiento y crecimiento de un mayor número de folículos (efecto FSH) sino que además, ejerció un efecto favorable sobre la calidad de los COC's recuperados (efecto LH). Además, Blondin *et al.*, (49) señalaron que ovocitos de hembras no estimuladas hormonalmente tuvieron menor competencia que los ovocitos de aquellas que fueron superestimuladas, lo cual concuerda con los resultados de esta investigación.

4.3 Respuesta de los ovocitos al Azul Brillante de Cresilo (BCB)

La prueba del BCB se basa en la capacidad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) de reducir el colorante en el citoplasma del ovocito, e indica el estado de crecimiento ovocitario. Por lo tanto, los ovocitos que terminaron su crecimiento reaccionan positivamente a la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB+), es decir, su citoplasma permanece teñido de azul debido a la ausencia de actividad de la G6PD. Por lo contrario, ovocitos con actividad negativa al BCB (BCB-) aún no han terminado su crecimiento y su citoplasma se encuentra incoloro debido a la reducción del colorante por la G6PD. Estos ovocitos no tienen la misma competencia para continuar con los procesos de maduración, fecundación y desarrollo embrionario (40).



Al valorar los resultados obtenidos en la prueba azul brillante de Cresilo (BCB), se determinó que el 100% de los ovocitos de calidad A en los cuatro tratamientos terminaron su crecimiento (BCB+), es decir reaccionaron positivamente al BCB. En relación a este hallazgo Pujol *et al.*, (40) y Adams *et al.*, (51) indicaron que ovocitos de mayor calidad morfológica tienen una mejor actividad de crecimiento frente a los ovocitos de menor calidad.

Al comparar la cantidad de ovocitos de calidad A disponibles en cada grupo, se observa que el tratamiento OPU 48h ($3,4 \pm 0,45$) proporcionó 2,4 veces más ovocitos preparados funcionalmente para continuar con el proceso de maduración (**Tabla 3**), que el tratamiento OPU 40h ($1,4 \pm 0,45$) ($P > 0,05$), y cerca de 7 ovocitos más que los grupos testigo 40h y 48h ($0,4 \pm 0,45$; $0,2 \pm 0,45$ respectivamente; $P < 0,05$).

La diferencia entre los ovocitos de calidad A del tratamiento OPU 48h comparado con los de OPU 40h, y los testigos 40h y 48h pudo haberse debido al tiempo transcurrido entre la administración de la FSH-LH y la realización del OPU 48h más tarde, coincidiendo con Blondin *et al.*, (49) quienes señalaron que un intervalo de tiempo adecuado entre ambos eventos permitió obtener un grupo homogéneo de ovocitos con mayor competencia para avanzar a estadios posteriores de desarrollo. Otros autores, como Adams *et al.*, (51) sugirieron que estos resultados podrían estar relacionados con el tiempo de permanencia del ovocito dentro del folículo y la posibilidad de que este logre mayor almacenamiento de ARNm y proteínas moleculares claves que potencian la capacidad de desarrollo del ovocito, y además, por la calidad ovocitaria obtenida.



En relación a los ovocitos de calidad B, con el tratamiento OPU 48h se obtuvieron más ovocitos ($2,4 \pm 0,49$), que fueron positivos al azul brillante de Cresilo (BCB+) que los demás grupos experimentales ($P < 0,05$), que no difirieron estadísticamente entre ellos; lo cual representa un 80% de actividad positiva en este tratamiento ($3,0 \pm 0,81$). Del total de ovocitos de calidad B recuperados en el tratamiento OPU 40h ($3,2 \pm 0,81$) únicamente el 31% de estos resultaron positivos al BCB ($1,0 \pm 0,49$).

En cuanto a los ovocitos BCB+ de las calidades C y D de los diferentes grupos en estudio, no presentaron diferencia estadística entre ellos ($P > 0,05$), **tabla 3**. Esto se ve reflejado en las investigaciones de Rodríguez *et al.*, (54) y Pujol *et al.*, (40) quienes valoraron la actividad de ovocitos de matadero sometidos a la BCB y obtuvieron un mayor porcentaje de BCB+ en ovocitos pertenecientes a la calidad A, con una tendencia a disminuir en el resto de calidades.

Tabla 3: Número de ovocitos que reaccionaron positivamente al Azul Brillante de Cresilo (BCB) de acuerdo al tratamientos y a la calidad ovocitaria (Media \pm error estándar)

Tratamientos	Calidad de los ovocitos					
	A	B	A+B	C	D	C+D
OPU 40h	1.4 ± 0.45^b	1.0 ± 0.49^b	2.4 ± 0.74^b	1.2 ± 0.55	0.8 ± 0.40	2.0 ± 0.83
OPU 48h	3.4 ± 0.45^a	2.4 ± 0.49^a	5.8 ± 0.74^a	1.4 ± 0.55	1.0 ± 0.40	2.4 ± 0.83
Testigo 40h	0.4 ± 0.45^c	0.4 ± 0.49^b	0.8 ± 0.68^c	1.2 ± 0.55	0.4 ± 0.40	1.8 ± 0.75
Testigo 48h	0.2 ± 0.45^c	0.2 ± 0.49^b	0.4 ± 0.68^c	0.8 ± 0.55	0.2 ± 0.40	1.0 ± 0.75

Leyenda: letras diferentes en la misma columna tienen diferencia ($P < 0,05$), (Tukey-Kramer, 1956).

La prueba del azul brillante de cresilo (BCB) permitió establecer que en el tratamiento OPU 40h el 52,2% de los COC's son viables (A+B) (**tabla 3**). Del



total de COC's viables recuperados (6,4) en el tratamiento OPU 48h el 90,6% (5,8) son BCB+, mostrando más eficiencia no solo en la calidad sino también en la viabilidad de los ovocitos que fueron recuperados 8h más tarde en las sesiones de OPU. En los tratamientos testigos el porcentaje de COC's viables BCB+ estuvo entre el 66,7%.

El promedio de COC's viables (A+B) que resultaron BCB+ en el tratamiento OPU 48h fue 2,4 veces más que en el tratamiento OPU 40h y proporcionó alrededor de 6 veces más COC's BCB+ en relación a los tratamientos testigos (40h;48h).

Todo esto es corroborado por Nivet *et al.*, (55) quienes determinaron que la ventana óptima para que el ovocito adquiera competencia (FSH-OPU) para su desarrollo se encuentra entre las 44 y 68h.

4.3.1 Actividad negativa al BCB

La cantidad de ovocitos recuperados que presentaron actividad negativa a la tinción de azul brillante de Cresilo (BCB-), no presentaron diferencias significativas ($P>0,05$) entre los tratamientos. Sin embargo, es importante resaltar que un 69% de ovocitos de calidad B del tratamiento OPU 40h fueron negativos a la prueba de BCB, es decir aún se encontraban en crecimiento y por ende no eran aptos para continuar con el proceso de maduración. Este resultado concuerda con lo estipulado por Adams *et al.* (51) quienes sugieren que este comportamiento está relacionado con un mayor tiempo que transcurre desde la aplicación de la hormona y la sesión de OPU. Por lo tanto, al reducir el tiempo en 8 horas no permite el almacenamiento de ARNm y proteínas moleculares



claves para potenciar la capacidad de desarrollo del ovocito y la calidad del mismo.



5. CONCLUSIONES

- La administración de una dosis de FSH-LH (Pluset®) 40 a 48 horas previas al OPU proporciono entre 1,7 y 2 veces más COC's por sesión que en los casos que no hubo estimulación ovárica.
- Realizar la sesión de OPU 48 horas posteriores a la aplicación de la hormona (Pluset®) permite obtener un mayor número de COC's de calidad A y B (aptos para PIV).
- El 100% de los COC's de calidad A recuperados 48 horas post aplicación de la hormona (Pluset®) han terminado su crecimiento y están listos para iniciar el proceso de maduración *in vitro* (MIV), es decir fueron BCB+.



6. BIBLIOGRAFÍA

1. Méndez Mendoza M, Serrano Papala J, Ávila Benítez R, Rosas García M, Méndez Palacio N. Caracterización morfométrica del bovino criollo mixteco. Archivos de Zootecnia. 2002; 51: p. 217-221.
2. Aguirre LR, Bermeo A, Maza D, Merino L. Estudio fenotípico y zoométrico del bovino criollo de la sierra Media y alta de la región sur del Ecuador (RSE). Acta Iberoamericana de Conservación Animal. 2011;: p. 392-396.
3. Zárate J, Ramírez J, Rodríguez F. Comportamiento reproductivo de vacas criollas con amamantamiento restringido y sincronización del estro. Agronomía Mesoamericana. 2010; 21(1): p. 121-130.
4. FAO. Animales de Granja: Un 20% se encuentra en peligro de extinción. Sitio Argentino de Producción animal. 2006;: p. 1.
5. Chasombat J, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. Ovarian Follicular Dynamics, Ovarian Follicular Growth, Oocyte Yield, In vitro Embryo Production and Repeated Oocyte Pick Up in Thai Native Heifers Undergoing Superstimulation. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2013 April; 26(4): p. 488-500.
6. Restrepo G, Gomez J, Vasquez N. Evaluation of the ovarian superstimulation and quality of bovine oocytes obtained by ovum pick up. Revista Politecnica. 2011 Diciembre;(13): p. 16-21.
7. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology. 1988 October; 30(4): p. 751-762.
8. Nava H, Hernandez H. Aspiración folicular transvaginal. In Manual de Ganadería de Doble Propósito.; 2005. p. 610-614.
9. Ding L, Tian H, Wang J, Chen J, Sha H, Chen J, et al. Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the



- preimplantation development of cloned bovine embryos. *Molecular reproduction and development*. 2008 December; 75(12): p. 1710-1715.
10. De Roover R, Bols P, Genicot G, Hanzen C. Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. *Theriogenology* 63. 2005 April; 63(7): p. 1902-1913.
 11. Blondin P, Guilbault L, Sirard M. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*. 1997 October; 48(5): p. 803-813.
 12. Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PE, et al. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*. 2006 Mayo; 65(8): p. 1631-1648.
 13. Ruiz S, Romero J, Astiz S, Peinado B, Almela L, Poto A. Application of Reproductive biotechnology for the recovery of endangered breeds: birth of the first calf of Murciana-Levantina bovine breed derived by OPU, in vitro production and embryo vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013 December; 48(6): p. e81-84.
 14. Bols P, Leroy J, Vanholder T, Van Soom A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology*. 2004 September; 62(5): p. 906-914.
 15. Rivadeneira. Ciclo Estral Bovino. In *Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos*. Lima; 2013. p. 1-15.
 16. Rippe C. El ciclo Estral. *The Dairy Cattle Reproduction Council*. 2009;: p. 111-116.



17. Schroeder Weisbach H. Fisiopatología Reproductiva de la vaca. Primera ed. Celsus LM, editor. Colombia: CELSUS; 1999.
18. Ptaszynska M, Sierra J. Compendium de reproducción animal. 1st ed. Intervet , editor. Carbajosa de la Sagrada (Salamanca); 2007.
19. Jacome Roca A, Baron Castañeda G. Fisiología Endocrina. Primera ed. Bogota: INET Colombiana S.A; 2005.
20. Cunningham J, Klein B. Fisiología Veterinaria. Cuarta ed. Saunders/Elsevier , editor. Barcelona: ELSEVIER; 2009.
21. Klein B. Cunningham Fisiología Veterinaria. Quinta ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
22. Palma GA. Biotecnología de la Reproducción. Segunda ed. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2008.
23. Sintex. Fisiología Reproductiva del Bovino. In ; 2005; Buenos Aires. p. 1-4.
24. Palomares S. Revisión de los protocolos empleados en la sincronización de celos en bovinos. [Online]. Bogotá; 2009 [cited 2017 Enero 12].
25. Muñoz R. Fisiología del gameto femenino. In González C, Madrid N, Soto E. Desarrollo Sostenible de la ganadería doble propósito. Caracas: On line; 2011. p. 505-514.
26. Sadler TW, Langman J. Langman Embriología médica. Primera ed. Kluwer W, editor. Barcelona; 2016.
27. Perea , Inskeep K, Flores J. Follicular development in ruminants. In ; 2014; Venezuela. p. 1-24.
28. Cerón J. Manejo reproductivo en bovinos en sistemas de producción de leche México: UNAM; 2012.



29. Campo MRd. Transferencia de embriones en bovinos: Metodos y Tecnicas. Monografías de Medicina Veterinaria. 2002 Dec; 6(2).
30. Sanchez MF. El ciclo Estral de la Vaca. Primera ed. Zaragoza: Servet, Diseño y Comunicacion S.L.; 2008.
31. Del Valle Diaz T. Dinamica folicular ovarica durante el ciclo estral en vacas de doble proposito. In González C, Madrid N, Soto E. Desarrollo sostenible de la Ganadería Doble Propósito.; 2008. p. 546-554.
32. Universidad Nacional Autonoma de México. Reproduccion Bovina. [Online].; 2012 [cited 2016 Diciembre 15].
33. Salinas A. Protocolos de sincronizacion y superovulacion para transferencia de embriones en bovinos. In ; 2011; Cuenca. p. 1-128.
34. Filipiak Y. Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. Veterinaria (Montevideo). 2016 Abril 13;(205): p. 1-21.
35. Díez C, Muñoz M, Caamaño J, Gómez E. Biotecnologías reproductivas: Producción y criopreservación de embriones in vitro. Tecnología Agroalimentaria. 2010;(8): p. 41-46.
36. Ruiz S. Ovum Pick UP(OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproduccion. In ; 2006; Murcia. p. 1-6.
37. Gonzalez J. Analisis de programas y protocolos de preparacion de hembras bovinas para realizacion de OPU en la obtencion de ovocitos para FIV. In ; 2013 junio; Oviedo. p. 1-32.
38. Peláez V. Producción in vitro de embriones bovinos. In ; 2011; Cuenca. p. 1-86.
39. Catala M, Izquierdo D, Uzbekova S, Morato R, Roura M, Romaguera R, et al. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest



mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*. 2011 October; 142(4): p. 517-527.

40. Pujol M, López-Bejar M, Paramio MT. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*. 2004 February; 61(4): p. 735-744.
41. Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 1989; 72(1): p. 68-78.
42. Le Guienne M. Atlas of the bovine oocyte. Diez ed.: AETE Newsletter; 1999.
43. Sakhong D, Vongpralub T, Katawatin S, Sirisathien S. Ovarian follicular patterns and hormone profile in Thai Native Cattle (*Bos indicus*). *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2011; 41(4): p. 439-447.
44. De Roover R, Feugang J, Bols P, Genicot G, Hanzen C. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008 April; 43(2): p. 239-45.
45. Garcia JR, Romero J, Astiz S, Ruiz S. Eficacia de la ablación foliular y de la administracion exogena de GNRH (DALMARELIN®) sobre la produccion y calidad ovocitaria en vacas de raza Murciano-Levantina. In Congreso Internacional ANEMBE DE MEDICINA BOVINA; 2012; Santander. p. 234-236.
46. Torres JdS, de F A Pires M, de Sá WF, de M Ferreira A, Viana JH, Camargo LS, et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2008 January; 69(2): p. 155-166.



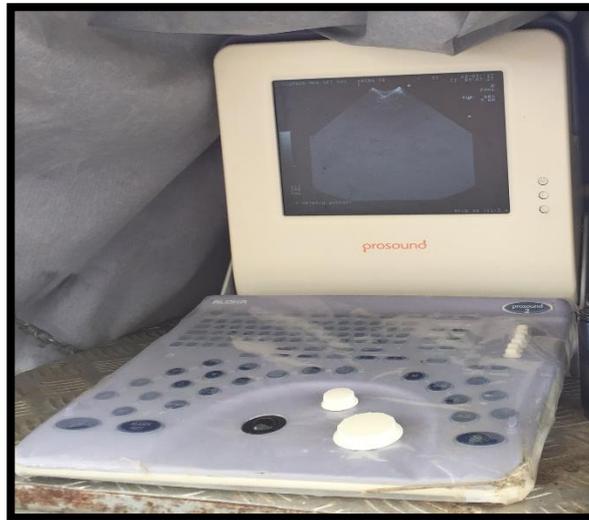
47. Garcia A, Salaheddine M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*. 1998 September; 50(4): p. 575-585.
48. Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent. *Biology of Reproduction*. 2002 January; 66(1): p. 38-43.
49. Blondin P, Vigneault C, Nivet AL, Sirard MA. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? *Animal Reproduction*. 2012 September; 9(3): p. 281-289.
50. Vassena R, Mapletoft R, Allodi S, Singh J, Adams G. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*. 2003 September; 60(5): p. 923-932.
51. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1992 January; 94(1): p. 177-188.
52. Bó GA, Guerrero DC, Adams GP. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*. 2008 January; 69(1): p. 81-87.
53. Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Animal Reproduction Science*. 1999 October; 57(1-2): p. 23-33.
54. Rodriguez-González E, López-Béjar M, Velilla E, Paramio MT. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*. 2002 March; 57(5): p. 1397-1409.



55. Nivet A, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, et al. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction*. 2012 February; 143(2): p. 165-171.

7. ANEXOS

Anexo 1: Materiales y equipos empleados



EQUIPO DE ECOGRAFÍA

Fuente: Autor



TRANSDUCTOR SECTORIAL

Fuente: Autor



GUIA DE PUNCION

Fuente: Autor



CAJAS PETRI

Fuente: Autor



ESTEREOMICROSCOPIO

Fuente: Autor



PIPETAS

Fuente: Autor



PLATINA DE CALEFACCION

Fuente: Autor



CAMARA DE CO₂

Fuente: Autor



MATERIALES DE CAMPO

Fuente: Autor



HORMONA EMPLEADA (PLUSET®)

Fuente: Autor



Anexo 2: Hormona superovulatoria

PLUSET®



PRESENTACION

Caja con 2 viales de 1000 U.I. de FSH y 1000 U.I. de LH.

APLICACIÓN: Inyectable

DESCRIPCION

Mezcla de gonadotrofinas hipofisarias de cerdo, para la inducción de la superovulación en bovinos.

COMPOSICION

Hormona folículo estimulante (FSH)	500 U.I.
Hormona luteinizante (LH)	500 U.I.
Vial de disolvente c.s.p.	20 ml.

ACCION

Inducción de la superovulación. La estimulación ovárica con la hormona foliculoestimulante (FSH) exógena, y bajos niveles de hormona luteinizante (LH), permite obtener un número de óvulos muy superior al que se produce en un ciclo reproductivo normal.

INDICACIONES

Inducción de la superovulación en vacas para incrementar el número de embriones producidos por las vacas.

CONTRAINDICACIONES

No administrar por vía subcutánea, ya que dicha vía carece de una buena absorción. El producto liofilizado es estable durante 24 meses, conservado a 25°C. El producto reconstituido se conserva durante 6 días mantenido entre 2-8° C y conservando las precauciones normales de esterilidad.

RESTRICCIONES DE USO

No precisa período de supresión.



Anexo 3: Operacionalización de las variables

VARIABLE	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
Variable independiente			
1. Tiempos de obtención de ovocitos	OPU (Ovum Pick Up) Practica biotecnológica que permite recuperar ovocitos in vivo en vacas, para recuperar ovocitos y verificar su calidad	Horas de ejecución OPU	40 horas 48 horas Post aplicación de la hormona.
Variables dependientes			
1. Cantidad de folículos	Valoración ecográfica de los folículos	Numero de folículos	Numero
2. Cantidad de Ovocitos	Cantidad de ovocitos obtenidos por OPU	Numero de COC's	Numero
3. Calidad de ovocitos Por: Lonergan <i>et al.</i> , (1994)	Valoración morfológica de los COC's	Cantidad de capas de células del Cúmulo y aspecto del citoplasma	A: Buena B: Intermedia C: Mala
4. Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Ovocitos con actividad enzimática	Reducción o Retención de la tinción Azul Brillante de Cresilo	Positiva: Ovocito Teñido Negativa: Ovocito no Teñido



Anexo 4: Hoja de campo general para las diferentes repeticiones del estudio

Repetición	Fecha OPU	Tratamientos	Cantidad de Folículos	# Folículos puncionados	# Ovocitos recuperados	Calidad de los ovocitos			Actividad 6GPD	
						A	B	C	Positiva	Negativa
1	13/12/16	T1V1								
		T2V2								
	20/12/16	Te1V1								
		Te2V2								
2	10/01/17	T1V2								
		T2V1								
	17/01/17	Te1v2								
		Te2V1								
3	24/01/17	T1V1								
		T2V2								
	31/01/17	Te1V1								
		Te2V2								
4	07/02/17	T1V2								
		T2V1								
	14/02/17	Te1V2								
		Te2V1								
5	21/02/17	T1V1								
		T2V2								
	07/03/17	Te1V1								
		Te2V2								



UNIVERSIDAD DE CUENCA

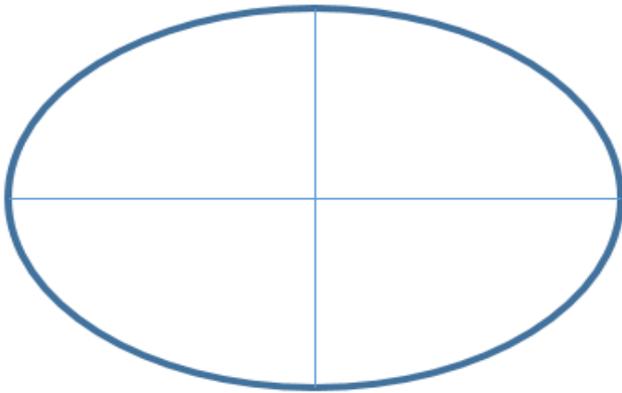
Anexo 5: Hoja de campo con cronograma de actividades a realizarse por maniobra (fecha)

Fecha Martes 13/12/16	# Folículos	Tamaño folículo (mm)	Ovocitos	Calidad	Actividad			
					Positiva		Negativa	
T1 (1222)	1	1--	1	1--	1		1	
	2	2--	2	2--	2		2	
	3	3--	3	3--	3		3	
	4	4--	4	4--	4		4	
	5	5--	5	5--	5		5	
	6	6--	6	6--	6		6	
	7	7--	7	7--	7		7	
	8	8--	8	8--	8		8	
	9	9--	9	9--	9		9	
	10	10--	10	10--	10		10	
TOTAL								
T2 (9857)	1	1--	1	1--	1		1	
	2	2--	2	2--	2		2	
	3	3--	3	3--	3		3	
	4	4--	4	4--	4		4	
	5	5--	5	5--	5		5	
	6	6--	6	6--	6		6	
	7	7--	7	7--	7		7	
	8	8--	8	8--	8		8	
	9	9--	9	9--	9		9	
	10	10--	10	10--	10		10	
TOTAL								



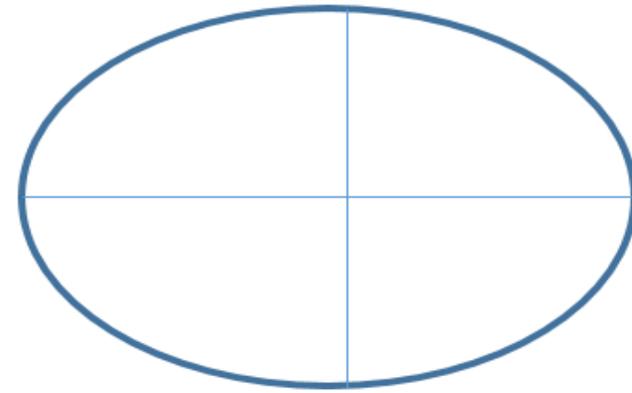
Anexo 6: Hoja de campo para valoración ecográfica de los folículos

OI

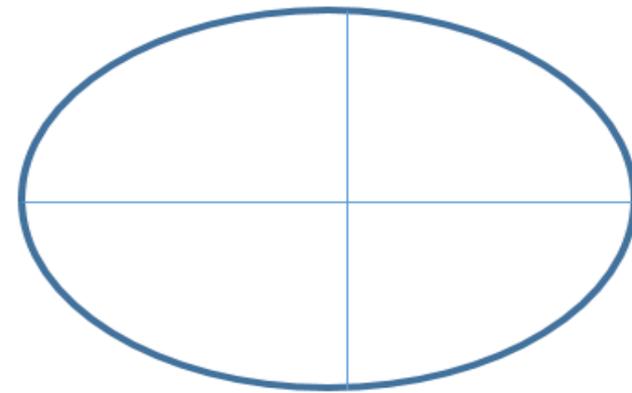
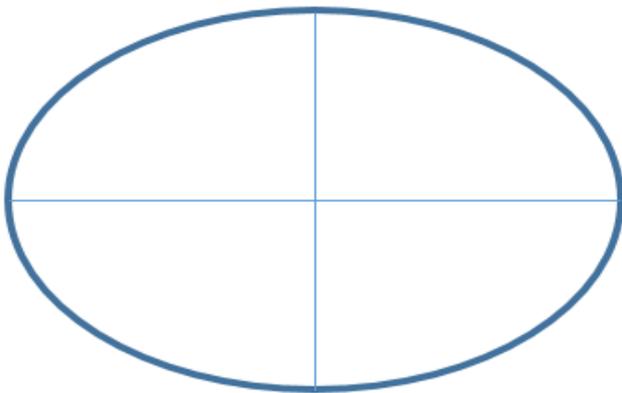


Vaquilla 1222

OD

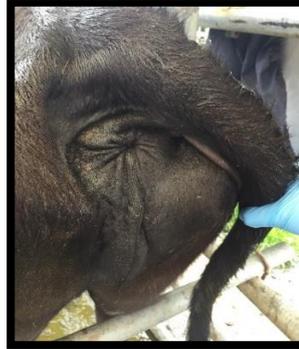


Vaquilla 9857



Anexo 7: Procedimiento a nivel de campo

1. Tranquilización
2. Vacío del contenido rectal y limpieza de la región perineal



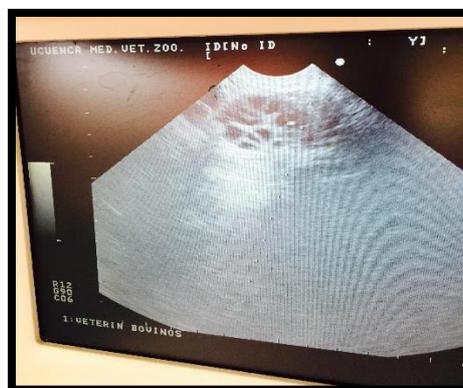
Fuente: Autor

3. Bloqueo epidural



Fuente: Autor

4. Visualización folicular



Fuente: Autor

5. Introducción de la guía de punción



Fuente: Autor

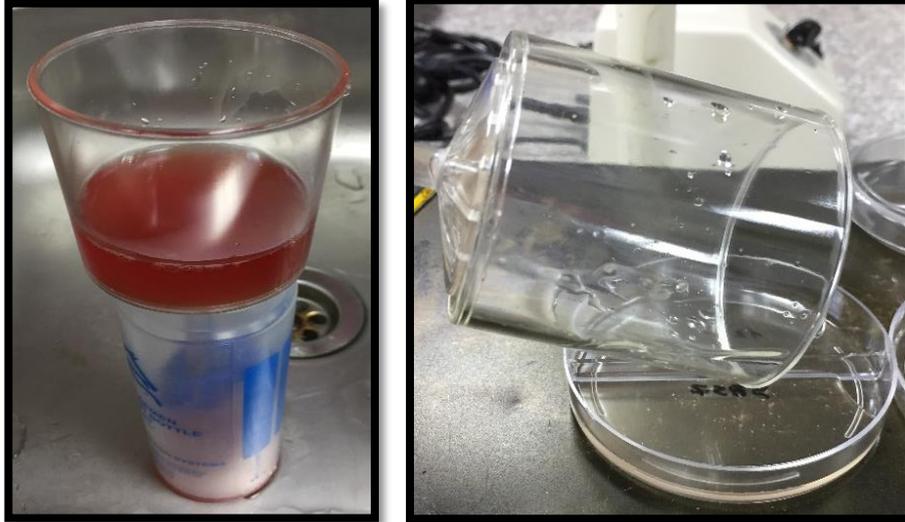
6. Aspiración Folicular



Fuente: Autor

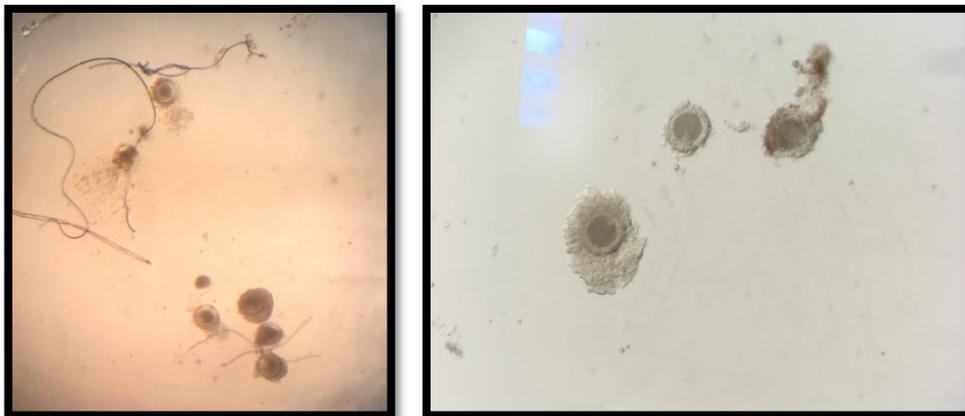
Anexo 8: Procedimiento a nivel de laboratorio

1. Filtrado



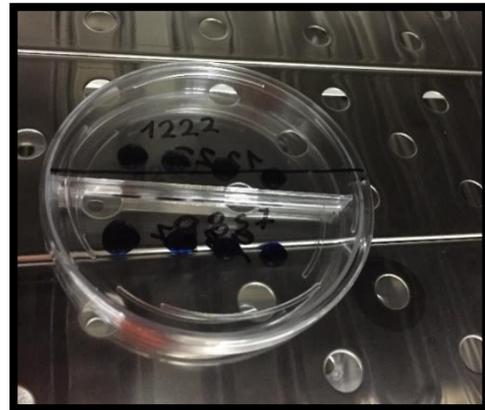
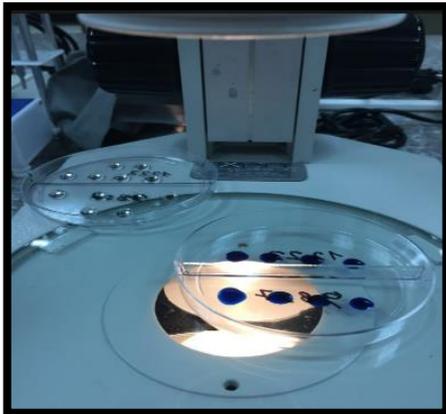
Fuente: Autor

2. Búsqueda y Clasificación



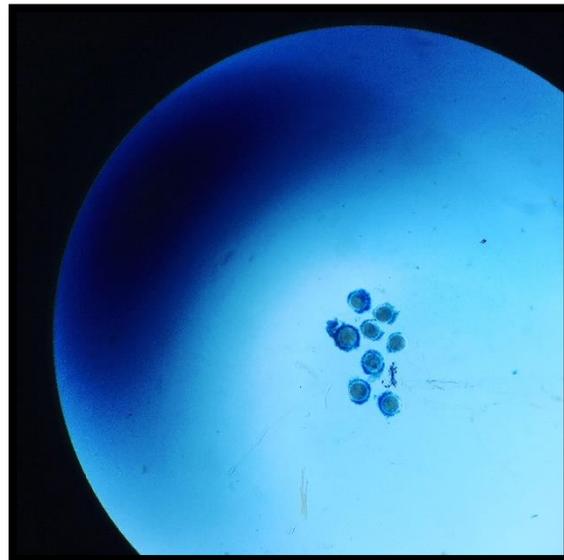
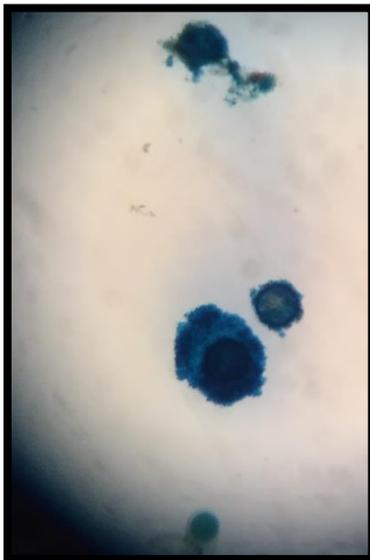
Fuente: Autor

3. Teñido y cultivo de los COC's



Fuente: Autor

4. Determinación de la actividad G6PD



Fuente: Autor