

# UNIVERSIDAD DE CUENCA



## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

*“Valoración de ovocitos obtenidos mediante Ovum pick-up en vaquillas sometidas a protocolos alternativos de sincronización de la onda folicular y estimuladas con FSH-LH”*

Tesis previa a la obtención del Título de  
Médico Veterinario Zootecnista

### AUTORES

Santiago Xavier Sarmiento Quito C.I.: 0104653084

Luis Miguel Naulaguari Tintín C.I.: 0106338601

### DIRECTOR

Luis Eduardo Ayala Guanga, PhD C.I.: 0102635463

**CUENCA – ECUADOR**

**2019**



## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por ovum pick-up (OPU) de vaquillas Holstein mestizas, sincronizadas mediante tres protocolos alternativos de reinicio de la onda folicular, seguido de estimulación ovárica con (FSH-LH). Las unidades experimentales (n=9) fueron divididas en tres grupos y alternadas a tres tratamientos (T1=ablación folicular; T2=GnRH; T3=benzoato de estradiol). Se usó un protocolo de sincronización estándar antes de cada repetición para homogenizar el ciclo estral (día 0: implante de progesterona 0.5g + 2mg BE; día 7: 0.5mg prostaglandina F2 $\alpha$  + colocación del parche colorimétrico detector de celo + retiro del implante, día 8: 1mg BE). El día de reinicio de la onda folicular en cada tratamiento, se aplicó 500UI de FSH-LH vía intramuscular, y a las 48 horas después se realizó OPU (tres repeticiones durante el estudio a intervalos de 21 días). Los datos fueron procesados en el programa estadístico SPSS versión 24, mediante la prueba de ANOVA para las variables cuantitativas y Chi-cuadrado para comparar porcentajes. No se encontraron diferencias estadísticas en el promedio de folículos visualizados (11.7, 9.8, 9.0, respectivamente,  $P>0.05$ ) o en el porcentaje de ovocitos recuperados (52.4, 55.7, 61.7%, respectivamente,  $P>0.05$ ), ni en las tasas de complejos cúmulo-ovocitos (COC's) aptos (47.3, 57.1, 52.0%, respectivamente,  $P>0.05$ ). En conclusión, la estimulación ovárica con FSH-LH al momento del reinicio de la onda folicular, logra promedios similares de folículos visualizados, así como semejantes porcentajes de COC's aptos recuperados para la producción de embriones *in vitro*, sin importar el método utilizado para reiniciar la onda folicular.

**Palabras claves:** REINICIO DE LA ONDA FOLICULAR, OPU, PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN, COC'S.



## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the quantity and quality of oocytes retrieved by Ovum pick-up (OPU) of native Holstein heifers, synchronized by three alternative protocols for restarting the follicular wave, followed by ovarian stimulation with (FSH-LH). The experimental units (n=9) were divided into three groups and interspersed in three treatments (T1= follicular ablation, T2= GnRH, T3= estradiol benzoate). A standard synchronization protocol was used prior to each repetition to homogenize its estrous cycle (day 0: progesterone implant 0.5g + 2mg BE, day 7: 0.5mg prostaglandin F2 $\alpha$  + estrus detection patch + implant removal, day 8: 1mg BE). On the day of restarting the follicular wave in each treatment, 500 IU of FSH-LH were applied intramuscularly. 48 hours later, the OPU was performed. (Three sessions were conducted during the study at intervals between sessions of 21 days). The data were processed in the statistical program SPSS version 24, by means of the ANOVA test for the quantitative variables and Chi square to relate percentages. No statistical differences were found in the mean number of follicles visualized (11.7, 9.8, 9.0, respectively,  $P > 0.05$ ) or in the percentage of recovered oocytes (52.4%, 55.7%, 61.7%, respectively,  $P > 0.05$ ) or in the averages of the cumulus oocyte complexes (COC) (47.3%, 57.1%, 52.0%, respectively,  $P > 0.05$ ). In conclusion, ovarian stimulation with FSH-LH at the time of the restart of the follicular wave, reached a similar average in the number of follicles visualized, as well as in the percentages of recovery of COC, for the production of embryos in vitro, regardless of the method used to restart the follicular wave.

**Keywords:** FOLLICULAR WAVE RESTART, OPU, SYNCHRONIZATION PROTOCOLS, COC.



## INDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	18
1.1. OBJETIVOS .....	20
1.1.1. Objetivo general.....	20
1.1.2. Objetivos específicos .....	20
1.2. HIPOTESIS .....	20
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	21
2.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN BOVINA.....	21
2.1.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina.....	21
2.1.2. Fisiología del ciclo estral bovino.....	24
2.1.2.1. Control Neuroendocrino del ciclo estral .....	24
2.1.2.2. Fases del ciclo estral .....	26
2.1.2.3. Dinámica folicular .....	27
2.2. PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL .....	29
2.2.1. Sincronización con Prostaglandinas .....	30
2.2.2. Sincronización con GnRH y PGF .....	31
2.2.3. Sincronización con progesteronas y estrógenos .....	31
2.2.4. Dispositivos de liberación de progesterona .....	32
2.3. EMERGENCIA DE LA ONDA FOLICULAR .....	33
2.3.1. GnRH.....	33
2.3.2. Benzoato de estradiol .....	34
2.3.3. Ablación folicular.....	34
2.4. ESTIMULACIÓN OVÁRICA.....	35
2.4.1. Estimulación con FSH.....	35
2.4.2. Combinación de gonadotropinas para la estimulación ovárica .....	35
2.4.3. Aplicación de FSH-LH.....	36
2.5. OVUM PICK UP .....	36
2.5.1. Generalidades .....	36
2.5.2. Frecuencia de OPU .....	37
2.6. CLASIFICACIÓN COMPLEJOS CUMULUS OVOCITOS .....	38
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	40
3.1. MATERIALES.....	40
3.1.1. Materiales biológicos .....	40
3.1.2. Materiales químicos .....	40
3.1.3. Materiales de campo.....	40
3.1.4. Materiales de laboratorio.....	41



3.2. METODOLOGÍA.....	41
3.2.1. Área de estudio.....	41
3.2.2. Unidades experimentales.....	42
3.2.3. Manejo preexperimental.....	44
3.2.4. Tratamientos.....	44
3.2.5. Sincronización .....	45
3.2.6. Inicio de tratamientos.....	45
3.2.7. Estimulación ovárica .....	46
3.2.8. Procedimiento OPU .....	46
3.2.9. Clasificación de los complejo cúmulo-ovocito .....	47
3.2.10. Variables de estudio .....	48
3.2.11. Análisis estadístico.....	49
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
4.1. Número de folículos visualizados .....	50
4.2. Número de folículos visualizados por repetición .....	53
4.3. Porcentaje de COC's recuperados .....	56
4.4. Calidad de COC's recuperados .....	59
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>64</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>74</b>



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Composición nutricional Sal mineral.....	43
<b>Tabla 2:</b> Composición del alimento concentrado. ....	43
<b>Tabla 3:</b> Conformación de grupos experimentales y repeticiones. ....	44
<b>Tabla 4:</b> <i>Criterio de evaluación de la calidad de los COC's, según Hawk &amp; Wall (91) y modificado por Samaniego et al. (87)</i> .....	48



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ilustración aparato reproductor de la hembra bovina. <b>Fuente:</b> (17).....	21
<b>Figura 2:</b> Ilustración desarrollo folicular. <b>Fuente:</b> (17).....	22
<b>Figura 3:</b> Esquema de interacción hormonal del eje Hipotálamo – Hipófisis – Ovario. <b>Fuente:</b> (23).....	26
<b>Figura 4:</b> Imágenes microscópicas. <b>I:</b> ovocito tipo A, <b>II:</b> ovocito tipo B, <b>III:</b> ovocito tipo C, <b>IV:</b> ovocito tipo D. <b>Fuente:</b> (87) .....	39
<b>Figura 5:</b> Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Experimental “IRQUIS” de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. <b>Fuente:</b> Google Maps, 2018. ....	42
<b>Figura 6:</b> Ilustración del protocolo de sincronización pre-experimental. <b>Fuente:</b> Autores.....	45
<b>Figura 7:</b> Protocolo tratamientos. <b>Fuente:</b> Autores. ....	46
<b>Figura 8:</b> Total de folículos visualizados en cada tratamiento en todo el experimento. ....	51
<b>Figura 9:</b> Promedio total de folículos visualizados en cada vaquilla en los tres tratamientos en estudio. Prueba de Tukey al 5%.....	51
<b>Figura 10:</b> Promedio de folículos visualizados en el ovario derecho e izquierdo en cada vaquilla en los tres tratamientos en estudio. Prueba de Tukey al 5%.....	53
<b>Figura 11:</b> Número total de folículos visualizados en cada repetición, sin considerar el tratamiento. ....	55
<b>Figura 12:</b> Número de folículos visualizados en cada repetición por tratamiento....	56
<b>Figura 13:</b> Porcentaje de folículos recuperados en cada tratamiento. Prueba de Chi cuadrado 5%. ....	57
<b>Figura 14:</b> Porcentaje de folículos recuperado en cada tratamiento por repetición Prueba de Chi cuadrado 5%. ....	59
<b>Figura 15:</b> Porcentaje de COC’s recuperados clasificados como aptos y no aptos para la PIV, en cada tratamiento. Prueba de Chi cuadrado 5% .....	61
<b>Figura 16:</b> Porcentaje de COC’s recuperados clasificados como aptos y no aptos para la PIV, en cada tratamiento por repetición. Prueba de Chi cuadrado 5% .....	62



## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1: Materiales cotidianos de campo .....</b>	<b>74</b>
<b>Anexo 2: Materiales y Hormonas para sincronización .....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo 3: Materiales empleados en los Tratamientos .....</b>	<b>76</b>
<b>Anexo 4: Material usado para estimulación ovárica .....</b>	<b>78</b>
<b>Anexo 5: Materiales y secuencia para Ovum pick-up.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 6: Plantilla de registro del número de folículos visualizados.....</b>	<b>81</b>
<b>Anexo 7: Materiales a nivel de laboratorio.....</b>	<b>82</b>
<b>Anexo 8: Plantilla de calificación de COC's.....</b>	<b>83</b>
<b>Anexo 9: Operacionalización de las variables.....</b>	<b>84</b>





## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

<b>BE:</b>	Benzoato de estradiol
<b>COC's:</b>	Complejo cumulus ovocito
<b>CL:</b>	Cuerpo lúteo
<b>eCG:</b>	Gonadotropina Coriónica Equina
<b>E2:</b>	Estradiol
<b>FSH:</b>	Hormona Folículo Estimulante
<b>GnRH:</b>	Hormona liberadora de Gonadotropinas
<b>g:</b>	Gramos
<b>hCG:</b>	Gonadotropina Coriónica Humana
<b>IATF:</b>	Inseminación artificial a tiempo fijo
<b>IM:</b>	Intramuscular
<b>Kg:</b>	Kilogramo
<b>LH:</b>	Hormona Luteinizante
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>ml:</b>	Milímetro
<b>mm:</b>	Milímetro
<b>mmHg:</b>	Milímetro de Mercurio
<b>OPU:</b>	Ovum pick-up
<b>PBS:</b>	Solución Buffer Fosfato
<b>PGF2<math>\alpha</math>:</b>	Prostaglandina
<b>PIV:</b>	Producción <i>in vitro</i> de embriones
<b>P4:</b>	Progesterona
<b>TE:</b>	Transferencia de embriones
<b>UI:</b>	Unidades Internacionales
<b><math>\mu</math>g:</b>	Microgramos



## CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

---

Yo, Santiago Xavier Sarmiento Quito en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Valoración de ovocitos obtenidos mediante Ovum pick-up en vaquillas sometidas a protocolos alternativos de sincronización de la onda folicular y estimuladas con FSH-LH*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 17 de enero de 2019

Santiago Xavier Sarmiento Quito

C.I: 0104653084



## CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

---

Yo, Luis Miguel Naulaguari Tintin en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Valoración de ovocitos obtenidos mediante Ovum pick-up en vaquillas sometidas a protocolos alternativos de sincronización de la onda folicular y estimuladas con FSH-LH*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 17 de enero de 2019

Luis Miguel Naulaguari Tintin

C.I: 0106338601



## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

---

Yo, Santiago Xavier Sarmiento Quito, autor del trabajo de titulación "*Valoración de ovocitos obtenidos mediante Ovum pick-up en vaquillas sometidas a protocolos alternativos de sincronización de la onda folicular y estimuladas con FSH-LH*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 17 de enero de 2019

Santiago Xavier Sarmiento Quito

C.I: 0104653084



## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

---

Yo, Luis Miguel Naulaguari Tintin, autor del trabajo de titulación "*Valoración de ovocitos obtenidos mediante Ovum pick-up en vaquillas sometidas a protocolos alternativos de sincronización de la onda folicular y estimuladas con FSH-LH*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 17 de enero de 2019

Luis Miguel Naulaguari Tintin

C.I: 0106338601



## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a Dios por su compañía y apoyo a lo largo de mi carrera, por darme fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de bendiciones, amigos y sobre todo de alegrías.*

*Le doy gracias a mi madre por los valores que me ha inculcado, por toda la confianza y apoyo silencioso que me dio durante toda mi educación. Sobre todo, por su humildad y excelente ejemplo de vida.*

*A mi hermano por ser un amigo y confidente. A mi tío Oscar que ha sido la figura paternal en el transcurso de mi vida, también agradezco a mis tíos Manuel, Fabiola y Pedro que me supieron brindar aliento para culminar este sueño.*

*A todos mis profesores, por su tiempo, dedicación, enseñanzas y amistad. Gracias doctor Luis por creer en Miguel y en mí, gracias por habernos brindado la oportunidad de aprender bajo su tutela.*

*A mis amigos por haber hecho de mi etapa universitaria una época grandiosa que nunca olvidaré, y para culminar y no menos importante a mi compañero de tesis, Miguel por la paciencia y amistad que me ha brindado.*

*Santiago Sarmiento Quito.*



## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por darme la vida, bendecirme y guiarme en mi camino. Siendo mí apoyo, mi fortaleza en los momentos más difíciles. Por darme la oportunidad de cumplir mis metas junto con mis seres queridos.*

*A mi mami Rosa por su amor, trabajo y sacrificio que me permiten cumplir mis sueños. Gracias madre mía al apoyo incondicional, en el transcurso de la vida cuando se presentan dificultades y tristezas siempre estás ahí.*

*A mi papi Miguel por su amor, trabajo y sacrificio. Por estar presente en los momentos más importantes y difíciles en el transcurso de mi vida. Sus enseñanzas, la pasión por la ganadería me han guiado a cumplir mis propósitos.*

*A mis hermanas Lucy y Sofía por ser parte fundamental de mis logros. Siempre están presentes cuando tengo dificultades, gracias por su amor, confianza y sacrificio. A mi sobrino Sebastián, gracias por tu compañía y sacarme una sonrisa todos los días.*

*A mis tíos quienes siempre tuvieron confianza en mí. En especial a mi tío Santiago y Juan, muchas gracias por sus consejos, por ser parte fundamental en la consecución de esta meta.*

*A los docentes por su tiempo, amistad y su dedicación a enseñar. En especial al Dr. Luis Ayala por la confianza incondicional, por ser profesor y amigo, gracias por guiarnos en la obtención de nuestro título profesional. A Santiago por confiar en mi persona, por la paciencia y amistad que siempre me has brindado.*

*A mis amigos de la universidad con quienes en el transcurso de la vida universitaria hicieron que fuese unas de mis experiencias más bonitas y alegres.*

*Miguel Naulaguari*



## DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con todo mi cariño a mi abuelita Zoila, por ser una persona imprescindible, un respaldo incondicional, por haber creído en mi capacidad.

Te quiero Abuelita.

Santiago Sarmiento Quito





## DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a mi madre Rosa Tintín por ser el pilar fundamental todos los días, por mi educación, tanto académica, como de la vida y por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ella.

Miguel Naulaguari



## 1. INTRODUCCIÓN

Según datos estadísticos de la International Embryo Technology Society (IETS) en el 2016, se reportaron 632 638 embriones bovinos transferidos a nivel mundial (1), en comparación con los 364 727 transferidos en el 2014 (2). Constatando un incremento cercano al 60% en el transcurso de dos años.

El notable auge del uso de esta biotécnica ha permitido que la producción de embriones *in vitro* (PIV) junto con otros avances, mejoren significativamente el campo de la reproducción, centrándose en optimizar la eficiencia de la asociación de biotecnologías, como es el caso de OPU-PIV, permitiendo un uso aún más amplio de estas técnicas.

Durante más de una década, la aspiración folicular guiada por ultrasonografía u *Ovum pick-up* (OPU) ha sido la herramienta de elección para recuperar ovocitos de vacas donantes vivas para PIV, ya que es una técnica versátil, empleada no solo para animales en diferentes estados fisiológicos sino también en vacas con trastornos reproductivos y vaquillas pre-púberes (3).

Sin embargo, se conocen muchos factores que influyen en los resultados de OPU-PIV, incluido el tamaño folicular, la fase de la onda folicular, la categoría animal y el grupo genético, pues existe una importante diferencia en la recuperación de ovocitos entre hembras *Bos indicus* y *Bos taurus* (4), (5). Dicha disimilitud afecta los resultados obtenidos, pues el ganado cebú facilita la obtención de una mayor cantidad de ovocitos en relación al ganado frison (6, 7, 8, 9).

Por esta razón, los resultados obtenidos en animales *Bos indicus* no pueden ser extrapolados a los *Bos taurus* (10), mucho menos bajo las condiciones nutricionales y ambientales del trópico alto de la Sierra ecuatoriana, donde predominan un genotipo Holstein mestizo (11), que por lo tanto, hace necesario estandarizar protocolos de reinicio de la onda y combinarlo con la estimulación ovárica para promover el crecimiento homogéneo de folículos y recuperar ovocitos competentes mediante la técnica de OPU para procedimientos de PIV.



Se ha demostrado que la sincronización de la onda folicular emergente puede ser hecha de forma mecánica a través de la ablación folicular (12) o farmacológicamente a través de tratamientos hormonales con estradiol, progesterona o GnRH (13, 14). Muchas investigaciones señalan que la recuperación de ovocitos por OPU una vez iniciada la onda folicular permitiría obtener una población más homogénea de ellos al momento de la aspiración, recuperándose así un mayor número de ovocitos viables (15). La estimulación ovárica con FSH por lo general ha dado los mejores resultados en términos de número de folículos aspirados y ovocitos recuperados (3).

Si bien existe información sobre protocolos para la estimulación ovárica y aspiración de ovocitos por OPU, con la finalidad de producir embriones *in vitro*, como ya se indicó, estos se encuentran estandarizados para Holstein Friesian estabuladas en condiciones diferentes a la del ganado Holstein mestizo del trópico alto de la Sierra ecuatoriana, que es alimentado principalmente al pastoreo y recibe una cantidad mucho menor de alimento balanceado que en los sistemas intensivos.



## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo general

Evaluar la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por *Ovum pick-up* (OPU) de vaquillas Holstein mestizas, sincronizadas mediante tres protocolos alternativos de reinicio de la onda folicular, seguido de estimulación ovárica con (FSH-LH).

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Valorar la respuesta ovárica al proceso de estimulación expresada en número de folículos (>5 mm) presentes en el día de sesión de OPU.
- Cuantificar la cantidad y calidad de complejos cúmulos ovocitos (COC's) obtenidos en los tres tratamientos.

## 1.2. HIPOTESIS

**Ha:** El número y calidad de ovocitos obtenidos por *Ovum pick-up* en vaquillas Holstein mestizas, previa sincronización del reinicio de onda folicular con tres protocolos diferentes seguido de estimulación ovárica con FSH-LH, difieren entre sí.

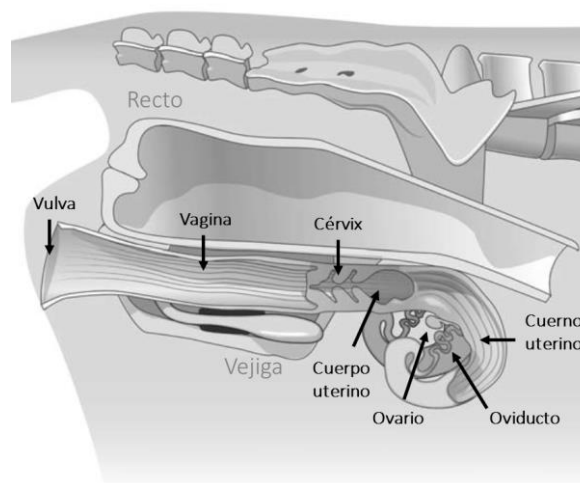
## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN BOVINA

#### 2.1.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina

Todo programa exitoso de reproducción animal está basado en un amplio conocimiento de la anatomía y fisiología reproductiva, pues existen cambios considerables en la topografía relacionados con la edad y la actividad fisiológica. Conocer dicha topografía representa una necesidad para dominar métodos de exploración ecográfica y palpación transrectal o aspiración folicular.

El aparato reproductor de la hembra está constituido por órganos internos (ovarios, oviductos, útero, cérvix, vestíbulo y vagina) y órganos externos (labios vulvares y clítoris), posicionados pelvi-abdominal a excepción de la vulva (16). Además, existen estructuras anatómicas como la vejiga y el recto que sirven de guía para posicionar las estructuras del aparato reproductor.



**Figura 1:** Ilustración aparato reproductor de la hembra bovina. **Fuente:** (17).

#### Ovarios

Órganos reproductores primarios con función dual, que producen ovocitos y hormonas sexuales (estrógeno y progesterona), durante los estadios del ciclo estral. Su tamaño y forma varían de acuerdo con la edad, con un rango de 35 x 25 x 15 mm

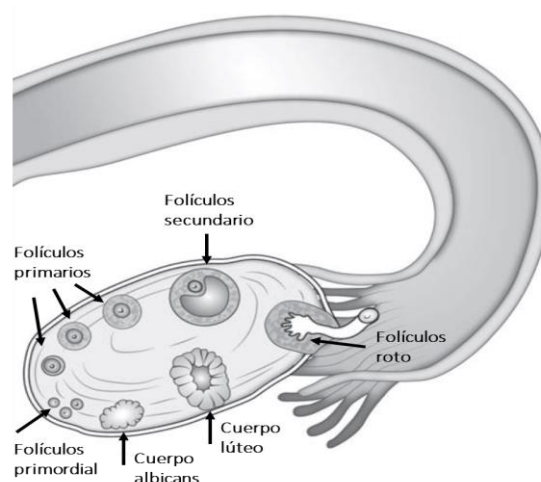
(17). Estructuralmente está compuesto por una corteza y médula, que conforman la parte externa e interna respectivamente.

Asimismo, la presencia de folículos o cuerpo lúteo (CL) en el ovario depende de la etapa del ciclo estral en el que se halle el animal (18). Usualmente se pueden encontrar varios folículos en cada ovario que varían de tamaño, siendo estos la unidad estructural y funcional de los ovarios, cuyo interior contienen líquido donde se hallan los ovocitos en desarrollo (19).

Al nacimiento, el ovario de una ternera tiene en promedio 150 000 folículos primordiales en estado de reposo, los cuales permanecen estables hasta cerca del cuarto año de vida cuando comienzan a descender. De éstos algunos crecen y únicamente el 0,05% alcanzan el estado preovulatorio (20, 21).

Están influenciados por hormonas gonadotropinas (FSH y LH) que ayudan a crecer y maduran los ovocitos que contienen(19). Los folículos además secretan los estrógenos que de cierta forma son responsables de la conducta sexual durante el celo (22). Con el tiempo, la mayoría de los folículos entran en regresión y mueren sin ovular, siendo reemplazados por una nueva oleada en crecimiento.

El CL surge sobre el sitio de la ovulación anterior, donde anteriormente ocupaba el folículo dominante. Puede ser palpado después del quinto día del ciclo como una estructura redonda y firme, en forma de corona, la cual sobresale del ovario (18). Secreta progesterona que inactiva la actividad sexual y prepara al útero para permitir la implantación del embrión y de mantener la gestación (23).



**Figura 2:** Ilustración desarrollo folicular. **Fuente:** (17).

## **Oviductos**

Estructura tubular que conecta el útero con el ovario, cuya función es la captación del ovocito y brindar el entorno para la fertilización de este (18). Conformado por tres segmentos: infundíbulo, rodea al ovario. Su forma de embudo recepta al ovocito después de la ovulación, sirve de reservorio de espermias hábiles y es el sitio donde ocurre la fecundación (19).

## **Útero**

Ubicado en la cavidad abdominal, es un órgano tubular clasificado como bicornual, se encuentra dividido en dos cuernos y un cuerpo los cuales conectan al oviducto con el cérvix (18). Su interior está recubierto por tres capas musculares: endometrio, miometrio y adventicia, de su interior a su capa más externa, respectivamente (17). La función principal del útero es proveer el ambiente óptimo para el desarrollo fetal.

## **Cérvix**

Conocida también como cuello uterino, forma parte del útero y es una estructura cilíndrica con bordes internos en forma de anillos tomando la apariencia de un esfínter (22). Este diseño le facilita la protección hermética del útero del medio ambiente exterior. Durante el celo, la musculatura lisa del cérvix se relaja bajo la influencia de estrógenos (19).

## **Vestíbulo**

El vestíbulo es parte del sistema de conductos de las hembras, se ubica entre la vulva y la vagina. Tiene la particularidad de ser común al sistema reproductor y urinario. La uretra se abre en el vestíbulo. Cumpliendo una doble función, permite que la orina salga del cuerpo y permite que el semen entre en la vagina y el útero (17).

## **Vagina**

Está ubicada en la cavidad pelviana y es un órgano dilatado para la cúpula (18). Entre la vagina y el vestíbulo se encuentra el anillo himenal, estructura de cierre musculoso. En las hembras bovinas jóvenes, usualmente, esta estructura se rompe durante la monta natural o cualquier maniobra biotecnológica la cual violenta su integridad (16).



## **Vulva**

Es la apertura externa del aparato reproductor. La conforman los labios vulvares derecho e izquierdo (22). La vulva aloja en su comisura ventral el clítoris, que es el homólogo femenino del pene, está conformado de cuerpos cavernosos (17), muy bien irrigados e innervados.

### **2.1.2. Fisiología del ciclo estral bovino**

El incremento del uso de biotecnologías ha acentuado la necesidad de tener un claro entendimiento de la función ovárica y los mecanismos neuroendocrinos que controlan el ciclo estral, pues de esto depende el éxito o fracaso de un programa reproductivo (23, 24, 25). El alto nivel de interés se refleja en el gran número de estudios publicados sobre la manipulación de este complejo proceso (26).

El ciclo estral es una sucesión de eventos de origen endocrino, dependientes de la interacción de varios órganos como el eje hipotálamo-hipófisis, ovario y útero (23). Los cambios que ocurren en el comportamiento durante este tiempo son evidencia de la presentación del estro (24). Que inicia con en la pubertad y continúan durante toda su vida útil, excepto en condiciones de preñez, anestro posparto o patologías.

El periodo estral dura en promedio 21 días (26). Los signos de celo se presentan gracias a la presencia de estrógenos provenientes del folículo, durante 6 a 30 horas. La ovulación es espontánea y ocurre 12 horas luego de finalizado el celo (27). Se ha demostrado que más del 70% de las actividades de monta ocurren entre las 6 p.m. y las 6 a.m. Además, cerca del 25% de las vacas tienen celos de menos de 8 horas de duración (24).

#### **2.1.2.1. Control Neuroendocrino del ciclo estral**

Todo el mecanismo está mediado por un sistema neuroendocrino muy complejo, donde cada uno de los órganos que intervienen, secreta una o más hormonas que, perfectamente sincronizadas, se unirán a los receptores específicos de los órganos diana involucrados y donde éstos últimos segregarán sus propias hormonas y producirán los efectos correspondientes, muchos de ellos apreciables externamente en el animal.





La expresión del comportamiento del estro inicia a partir de señales sensoriales generadas por los órganos de los sentidos (vista, olfato y tacto), las cuales son transmitidas al cerebro en forma de mensajes, donde se transcribe en impulsos y se envían mediante ayuda de fibras nerviosas hasta el hipotálamo, consecutivamente a la hipófisis, órganos encargados de dirigir la actividad y dar inicio la función sexual (27).

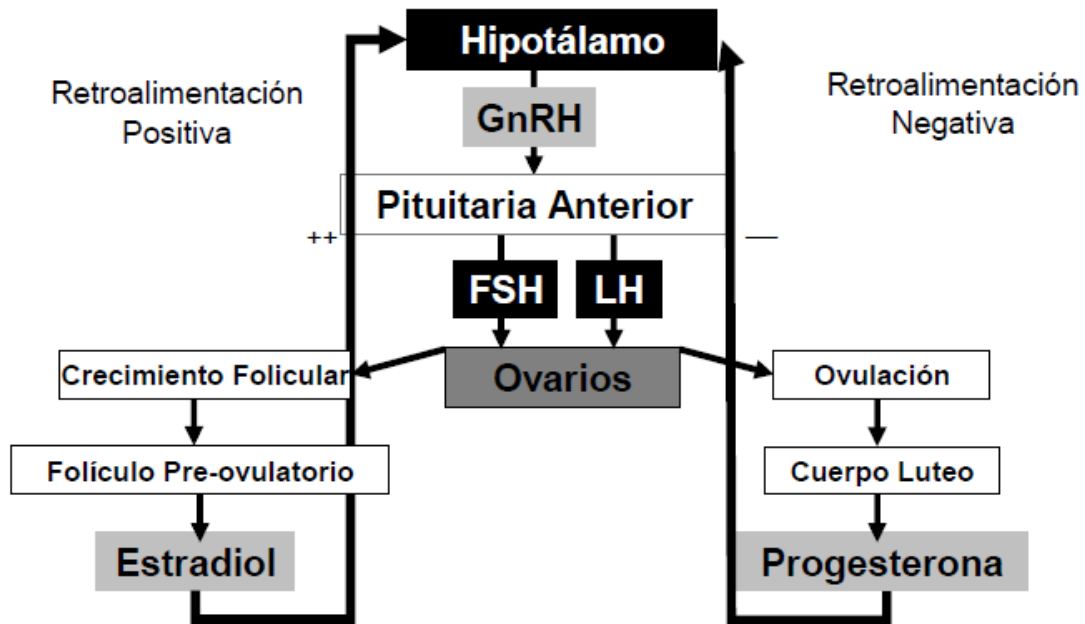
Las principales hormonas involucradas en estas fases son: la GnRH u hormona liberadora de gonadotropinas hipofisarias, secretada por el hipotálamo; la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) secretadas por la hipófisis; el estradiol (E2), inhibina y progesterona (P4) producidas en los ovarios y la prostaglandina (PG F2 $\alpha$ ) secretada por el útero (23, 26).

La GnRH se difunde a través de los capilares al sistema hipofisiario y de allí a las células de la hipófisis anterior, en donde su función es estimular la producción y secreción de FSH y LH, entre otras. La FSH es la encargada del proceso de esteroideogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular, la LH es interviene en el proceso de ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (23).

Los estrógenos provienen del folículo ovárico, tienen acciones sobre el sistema nervioso y distintos órganos como las trompas de Falopio, útero, vagina y vulva provocando la conducta de celo. Los estrógenos tienen un efecto de retroalimentación positiva sobre el hipotálamo produciendo la liberación de GnRH que a su vez inducirá la liberación de FSH y LH en la hipófisis anterior (23, 28).

La inhibina interviene en el mecanismo de regulación de secreción de FSH y tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la adenohipófisis produciendo una menor secreción de FSH. La progesterona es también una hormona esteroide producida en el cuerpo lúteo por acción de la LH, produce un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo disminuyendo la producción de GnRH (23).

La PGF2 $\alpha$  es un compuesto que se sintetiza y almacena en las glándulas uterinas, interviene en la regulación del ciclo estral. Este compuesto actúa en muchos tejidos del organismo, en el ovario reduce el flujo sanguíneo e interrumpe la síntesis de hormonas, provocando un efecto de luteólisis o regresión del cuerpo lúteo. Durante la gestación sus niveles decaen hasta la nulidad (23).



**Figura 3:** Esquema de interacción hormonal del eje Hipotálamo – Hipófisis – Ovario. Fuente: (23).

#### 2.1.2.2. Fases del ciclo estral

Al ciclo estral se lo define como el tiempo entre dos celos. Está dividido en 2 fases que se clasifican fisiológicamente en proestro, estro (que corresponden a la fase folicular), metaestro y diestro (fase lútea) (23, 24). Para efectos de mejor entendimiento, la descripción se realizará a partir de la destrucción del cuerpo lúteo, del ciclo estral anterior y finalizará con el día de celo del siguiente ciclo.

##### Proestro

Inicia con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y culmina con el inicio del estro, dura entre 2 a 3 días. La destrucción del CL ocurre por acción de la  $PGF2\alpha$ , provocando la caída de los niveles de progesterona y con ello el efecto de retroalimentación negativa que ejercía a nivel hipotalámico desaparece y comienza a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas FSH y LH las cuales estimulan el crecimiento folicular (23).

Aunque muchos folículos antrales se desarrollan durante este periodo, solo uno será seleccionado como folículo dominante (FD) y llegará a la ovulación (24). Este FD es estimulado por las hormonas FSH y LH para producir estrógenos. El incremento en



los niveles de estrógenos alcanza los centros nerviosos del hipotálamo que controlan las manifestaciones externas de celo (23).

### **Estro**

El estro se define como un periodo de actividad y receptividad sexual (27). La continua producción de estrógenos genera un pico en la liberación de LH y FSH. Los elevados niveles de E2 son responsables del comportamiento y signos propios del celo (24). Se considera una duración de 18 horas como tiempo promedio, luego el SNC se hace refractario a los estrógenos y todas las manifestaciones de celo desaparecen (23).

### **Metaestro**

Inmediatamente finalizado el estro inicia el metaestro que dura de 3 a 5 días. Durante esta fase ocurre la ovulación, que tiene lugar entre 28 a 32 horas después iniciado el celo. Después de la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico, seguida de la luteinización de las células foliculares que se transformaran en células luteales (24, 26).

### **Diestro**

Es la fase más prolongada del ciclo estral, tiene una duración de 15 a 18 días. Esta fase se caracteriza por la presencia y dominio del cuerpo lúteo y la producción de progesterona, que alcanza sus niveles más altos en torno al día 10 del ciclo estral hasta el día 16 o 18. Si la vaca está preñada, el CL se mantiene y se mantiene los niveles altos de P4, caso contrario habrá la regresión del CL por acción de la PGF2 $\alpha$  y se reinicia el ciclo (23, 24, 29).

#### **2.1.2.3. Dinámica folicular**

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos primordiales que conllevan al desarrollo de un folículo preovulatorio (26). En bovinos se produce de acuerdo con un patrón de ondas de crecimiento folicular (30), desarrollándose al azar en los dos ovarios previo a la pubertad, durante la gestación (31) y durante el periodo postparto (32, 33).



Las ondas de crecimiento y desarrollo folicular ocurren dentro de un ciclo estral y cada una de ellas comienza con el reclutamiento inicial de un grupo de folículos en crecimiento, sin ninguna clara preferencia de raza o edad específica para un patrón de onda folicular (26). Por ultrasonografía transrectal, se demostró que el modelo de ondas de crecimiento folicular comienza ya a las dos semanas de edad (28, 34).

El primero en postular la teoría de las ondas foliculares fue Rajakoski *et al.* (35) en 1960. Sin embargo, no fue hasta en la década del ochenta, cuando Pierson y Ginther (36) utilizaron la ecografía en el ganado bovino, demostrando que más del 95% de los ciclos estrales se componen de 2 o 3 ondas foliculares (26), aunque una o cuatro ondas pueden presentarse también (38, 39).

No obstante, existe una particularidad observada entre *Bos taurus* y *Bos indicus* respecto al número de ondas por ciclo estral. Investigaciones realizadas en animales de la raza Holstein han demostrado la predominancia de 2 o 3 ondas de crecimiento folicular por ciclo estral. En cebuínos se describen 3 ondas, habiendo sido descrito también 4 ondas de crecimiento folicular por ciclo estral (28).

Goodman y Hodgen (39) en 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, múltiples estudios actualmente especifican que una onda de crecimiento folicular está compuesta de cuatro etapas: reclutamiento, selección, desviación y dominancia (21, 39, 41).

**Reclutamiento:** Engloba el desarrollo de una cohorte o grupo de folículos que comienzan a madurar bajo un aporte dependiente de gonadotropinas. El desarrollo sincronizado de folículos de 2-4 mm en ambos ovarios está caracterizado por una baja concentración de E2, P4, ausencia de inhibina y aumento de FSH, esta estimulación se prolonga por 2-4 días hasta que uno de ellos es seleccionado (28).

**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 (41). Además, esta fase se caracteriza por alza de E2, aumenta la amplitud de la LH, ausencia de inhibina y presencia de IGF-I y activina-A (42).



**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. Se ha señalado también que el folículo seleccionado suprime la secreción de FSH, dando como resultado final la pérdida de los folículos subordinados (31, 43).

Los receptores para FSH están presentes solo en las células de la granulosa, mientras que los receptores de LH se encuentran tanto en la granulosa como en las células de la teca de los folículos antrales. El FD adquiere más receptores de LH en sus células de la granulosa que sus subordinados y, por lo tanto, cambiando su dependencia a LH durante el pico de FSH y continuar creciendo mientras los subordinados sufren atresia (43).

**Dominancia:** El folículo dominante alcanza un diámetro de 10mm (40) 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 12 a 24 horas antes de la aparición de una nueva folicular (23, 36). La atresia se presentará solo en aquellos folículos no ovulatorios (41).

## 2.2. PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL

Un área de interés para los investigadores en estos últimos años ha sido el desarrollar técnicas que controlen el ciclo estral en los bovinos, de manera tal que induzcan de forma sincronizada el celo (44). Si bien han experimentado con varios protocolos aún es un factor limitante la baja eficiencia, el trabajo necesario para una efectiva sincronización y por ende la detección de celo (24, 45).

Estos protocolos han sido asociados principalmente al uso de la inseminación artificial convirtiéndola a tiempo fijo (IATF) (46) y a la utilización de programas de transferencia de embriones (TE), buscando así incluir protocolos de sincronización viables que potencialicen el mejoramiento genético y eleven la eficiencia del control del ciclo estral en los bovinos (47).

De esta manera, frente a los resultados satisfactorios de los manejos de sincronización y el interés en incorporar las ventajas de la TE, estudios han evaluado el manejo de la resincronización asociando las biotecnologías de IATF y TETF, que



se basan en la utilización de fármacos comercialmente disponibles para sincronizar el ciclo estral (47).

La primera propuesta referente a un método capaz de manipular al ciclo estral partió de Christian y Casida en 1948 que surgieron usar progesterona con el fin de bloquear la función reproductiva. Más tarde en 1968 Wiltbank y Kasson verificaron que la adición de un estrógeno al inicio del tratamiento a través de su efecto luteolítico, aumentaba la incidencia de celos en los animales (47).

Desde el punto de vista práctico, hay dos métodos para la sincronización del ciclo estral. Los que comprenden la utilización de agentes luteolíticos que lleva a una anticipación a la regresión del cuerpo lúteo a través de la aplicación exógena PGF2 $\alpha$ , y el segundo mediante alargamiento del ciclo con una simulación de diestro a través de la administración de progestágenos (46, 48, 49).

### **2.2.1. Sincronización con Prostaglandinas**

En 1972 Rowson *et al.* (50) propusieron un protocolo para sincronizar celos en bovinos utilizando PGF2 $\alpha$  como agente luteolítico, pues causa la regresión del CL a partir del día 5 del ciclo estral y su efecto es máximo entre los días 12 y 17 (48)(45)(28). Uno de los primeros protocolos utilizados fue el tratamiento de 2 dosis de PGF2 $\alpha$ , con un intervalo de 10 u 11 días entre dosis (46, 49).

Teóricamente, todos los bovinos deberían tener un CL que responda a la PGF2 $\alpha$  en el segundo tratamiento y la manifestación de celos se agruparía en un periodo de 3 a 5 días (46, 51). El problema central en el uso de la PGF2 $\alpha$  está relacionado con la dificultad de obtener una adecuada sincronía de los celos ya que es posible observar celo durante un período de hasta 5 días después (52).

Podría ser atribuido al estado de la onda folicular en el momento del tratamiento ya que la PGF2 $\alpha$  es incapaz de alterar la dinámica de la onda folicular (53). Pursley *et al.* (54) demostró que el momento de ovulación en ciclos inducidos con prostaglandinas presenta grandes variaciones. Por este motivo la detección de celo se hace imprescindible cuando se pretende adoptar la inducción de ciclos con ovulación (48).



### 2.2.2. Sincronización con GnRH y PGF

Pursley *et al.* (54) publicaron un protocolo de sincronización hormonal conocido como Ovsynch que combina GnRH y PGF $2\alpha$  para controlar la fisiología ovárica. Este protocolo consiste en una inyección de GnRH, seguida 7 días más tarde por una inyección de PGF, una segunda inyección de GnRH 48 h después de la PGF $2\alpha$  e IATF 15 h después (45, 55).

El objetivo de la primera inyección de GnRH es inducir la liberación de LH, resultando en la ovulación del folículo dominante y en la emergencia de una nueva onda folicular 2 días después (56). La administración de PGF 7 días después induce la lisis del CL y la segunda inyección de GnRH induce la liberación de LH que sincroniza la ovulación (35, 45).

El protocolo Ovsynch ha sido mucho más eficaz en vacas lecheras en lactancia que en vaquillonas (46). También han sido utilizados para sincronizar la ovulación en receptoras que recibieron embriones producidos *in vivo* o *in vitro* (45). Además, el tratamiento con GnRH induce la ovulación con la emergencia de una nueva onda folicular aproximadamente 2 días después del tratamiento (56).

### 2.2.3. Sincronización con progesteronas y estrógenos

Los progestágenos son compuestos similares a la progesterona que están en el mercado desde hace varios años (45), alteran la función ovárica posibilitando una buena sincronía del estro y ovulación (57). La progesterona reduce la frecuencia de los pulsos de LH, lo cual a su vez suprime el crecimiento del folículo dominante según la dosis (46).

Es importante destacar que la progesterona no suprime la secreción de FSH, por lo tanto, las ondas foliculares siguen emergiendo en presencia de un CL funcional (58) (49). Posteriormente, la combinación de estos tratamientos con benzoato de estradiol (BE), con efectos luteolíticos, posibilitaron el acortamiento de la acción de la progesterona (57).

El uso de estrógenos y progestágenos para controlar el desarrollo folicular se basa en el potente efecto de la combinación de estos esteroides sobre las gonadotropinas (3). El protocolo más utilizado, consiste en administrar 2 mg de BE por vía



intramuscular en el momento de la inserción del dispositivo intravaginal con P4 (día 0), para sincronizar el desarrollo folicular (7, 20, 45).

En el día 7 se retira el dispositivo intravaginal con progesterona y se administra prostaglandina para inducir la luteólisis, y en el día 8 se coloca 1 mg de benzoato de estradiol para sincronizar la ovulación. Se realiza la IATF entre las 52 y 56 h del retiro del dispositivo ya que la mayoría de los animales ovulan en promedio a las 66 h (15, 45).

#### **2.2.4. Dispositivos de liberación de progesterona**

Existen diferentes dispositivos intravaginales comercialmente disponibles aprobados en varios países los cuales están impregnados con diferentes cantidades de progesterona, como, por ejemplo: CIDR-B (1,9 g de progesterona), PRID (1,55 g de progesterona), DIB (1 g o 0,5 g de progesterona), DISPOCEL (1 g de progesterona), entre otros (48, 49).

El dispositivo es introducido en la cavidad vaginal a través de un aplicador semejante a un espejo que mantiene las extremidades de la T aproximadas a manera de facilitar su introducción. La extremidad distal del dispositivo contiene un filamento de nylon que al final del periodo de utilización sirve para la remoción del dispositivo por tracción (48, 59).

La progesterona liberada del dispositivo intravaginal Bovino (DIV-B®) es estructuralmente idéntica a la endógena y tiene un rol importante sobre la dinámica folicular (59). Estudios revelan que las vacas no muestran evidencia de molestia con ninguno de los dispositivos, tampoco existen pérdidas ni diferencias en los picos de las concentraciones de progesterona (49).

Los niveles supraluteales (>1 ng/mL) obtenidos a los pocos minutos de la introducción de los dispositivos provocan la regresión del folículo dominante y aceleran el recambio de las ondas foliculares. El cese de la secreción de estrógenos e inhibina produce el aumento de FSH que va a ser la responsable del comienzo de la emergencia de la siguiente onda folicular (59).

Por otro lado, la extracción del dispositivo provoca la caída de la P4 a niveles subluteales (<1 ng/mL) que inducen el incremento de la frecuencia de los pulsos de





LH, el crecimiento y la persistencia del folículo dominante con concentraciones muy altas de estradiol que provocan por un lado el celo y a nivel endocrino inducen finalmente el pico de LH que es seguido por la ovulación (59, 60).

### **2.3. EMERGENCIA DE LA ONDA FOLICULAR**

El desarrollo de protocolos que controlen la emergencia de la onda folicular y la ovulación ha permitido aumentar significativamente el número de ovocitos recuperados (61) sin embargo se encuentran muy por debajo de las expectativas ya que algunos factores como raza, medioambiente y manejo influyen en el comportamiento folicular provocando una baja respuesta (62, 63).

Además, protocolos diseñados arbitrariamente y la variabilidad en la respuesta a los tratamientos hormonales, limitan tanto la aplicación generalizada como el éxito de estos métodos (60). Existen varias alternativas farmacológicas para sincronizar la aparición de una nueva onda folicular, (54, 64), pese a que en varios países se ha restringido el uso de hormonas sintéticas (51).

El tratamiento exógeno más empleado para sincronizar el inicio de ondas foliculares durante muchos años han sido los esteres de estradiol y los progestágenos, que inducen atresia folicular e inician una nueva onda 4 días después (61). En países donde impiden el uso de estradiol, han recurrido a la administración de GnRH para inducir la ovulación 1.5 a 2 días después (65, 66).

Souza *et al.* (67), Vasconcelos *et al.* (68), Wiltbank *et al.* (69) han sugerido un método alternativo, que consiste en suprimir mediante ablación mecánica el folículo dominante o folículos mayores a 5mm e inducir el reinicio de una nueva onda 1,5 a 2 días después. El inconveniente de este método es que hay que contar con un equipo de ultrasonografía modificado y personal capacitado.

#### **2.3.1. GnRH**

La GnRH es una proteína producida por el hipotálamo que ejerce una acción farmacológica directa sobre receptores específicos de la adenohipófisis estimulando la liberación de FSH, LH (70) e indirectamente aumenta los niveles de progesterona. Además, induce la ovulación y la lutenización del folículo dominante. Posteriormente estimula el crecimiento de una nueva onda folicular (47, 56).



Se ha demostrado que después de la ovulación inducida por GnRH aplicada exógenamente, la nueva onda folicular surge aproximadamente 1,5 a 2 días (61). Su vida media es prolongada, lo que los hace más potente que la GnRH endógena (71). La GnRH en dosis de 250 µg incrementa las concentraciones plasmáticas de la FSH y LH tiene una duración que varía entre seis y 28 horas (41).

### **2.3.2. Benzoato de estradiol**

El estradiol o uno de sus ésteres se han utilizado con éxito para sincronizar la aparición de ondas foliculares (65). El tratamiento con estradiol exógeno durante la fase lútea induce la atresia del folículo dominante, muy probablemente al suprimir la LH y la FSH (66, 70). Todos estos sucesos biológicos, inducen la emergencia de una onda folicular sincrónica (60).

Los estrógenos exógenos como el BE administrados cuando existen altos niveles de progesterona inducen la regresión de un posible cuerpo lúteo en formación y la atresia del folículo dominante, puesto que son potentes agentes luteolítico en los primeros días del ciclo. Todos estos sucesos biológicos, inducen la emergencia de una onda folicular sincrónica (60, 70).

En una serie de estudios por *Bó et al.* (60, 66) encontraron que el tratamiento con E2 suprimía la fase de crecimiento del folículo dominante y la supresión fue más profunda cuando se administró en combinación con P4 . Por lo tanto, este tratamiento permite que una nueva cohorte de folículos de 3 a 5 mm crezca 4 días después al mismo tiempo (61).

### **2.3.3. Ablación folicular**

La ablación folicular consiste en la aspiración de los folículos mayores a 5 mm presentes en los ovarios de hembras vivas, mediante ultrasonografía a través de la pared vaginal (43). Esta acción provoca el comienzo sincrónico de una nueva onda folicular 1,5 días después. Aunque la ablación folicular ha demostrado ser altamente efectiva, para usar esta técnica se requiere de un equipo de ultrasonografía, un transductor sectorial, una bomba de aspiración, un sistema de guía de la aguja y un personal capacitado (3, 72).



## 2.4. ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Los procesos de superestimulación hormonal han sido desarrollados para estimular folículos, y destinar sus ovocitos a procesos biotecnológicos reproductivos como la TE u OPU acoplada a PIV (71). Por lo tanto, la mayoría de los protocolos involucran el inicio de tratamientos super estimulatorios subsiguientes al control exógeno de la aparición de ondas foliculares (61).

### 2.4.1. Estimulación con FSH

De las hormonas utilizadas de manera exógena (es decir, GnRH, FSH y eCG), la FSH genera mejores resultados en términos de número de folículos aspirados y ovocitos recuperado (61). Goodhand *et al.* (73) concuerdan que el tratamiento con FSH aumenta significativamente el número de folículos aspirados y da como resultado más ovocitos de mejor calidad (71, 74).

Se ha demostrado que los folículos de mayor tamaño contienen ovocitos con más capacidad de desarrollarse en la fase de blastocisto que los ovocitos encerrados en folículos más pequeños (75). Roover *et al.* (74) observaron que la estimulación con FSH aumentó la tasa de desarrollo de blastocistos, 18% en promedio sin estimulación, y 29% con la estimulación de FSH antes de OPU.

Sin embargo, la FSH por si sola puede tener un efecto desfavorable para el logro de una adecuada competencia en el desarrollo de los ovocitos (71). Lo cual es explicado por un crecimiento folicular acelerado que induce asincronía entre la maduración del ovocito y su folículo circundante, resultando en tasas de desarrollo reducidas (76).

### 2.4.2. Combinación de gonadotropinas para la estimulación ovárica

Como una posible solución, Restrepo *et al.* (71) han sugerido reducir en los protocolos la administración de FSH durante las fases finales del crecimiento folicular, y combinarla con LH exógena para la estimulación folicular. También se ha informado una mayor respuesta superovulatoria después del tratamiento de FSH más 20% de LH (66).

Se supone que la administración de gonadotropinas exógenas aumenta el número de folículos antrales y reduce el número de folículos atresicos. Una dosis de FSH-LH y



un régimen de tratamiento adecuados son esenciales para una respuesta ovárica efectiva a la superovulación. Mientras la FSH estimula el crecimiento folicular, es necesario un mínimo aporte de LH para obtener ovulaciones múltiples (77).

Aunque la tasa de bioactividad FSH-LH (Pluset®) se mantiene 1:1, su actividad principal es la de estimular el folículo, debido a la corta vida media de la LH porcina. FSH y LH, tanto endógenas como exógenas, se eliminan del organismo a través de los riñones, por filtración glomerular, seguida por excreción en la orina o bien por degradación por las células del túbulo proximal (77).

### **2.4.3. Aplicación de FSH-LH**

La mayoría de los regímenes para la FSH implican tratamientos múltiples, separados 12 o 24 h, durante 2 a 4 días. Algunos estudios han utilizado una única dosis de FSH por tratamiento antes de la OPU para evitar el estrés relacionado con la manipulación repetida (3). Además, los diferentes tiempos de recuperación de ovocitos entre intervalos de OPU, influye en la calidad de los COC's (15).

Blondin *et al.* (78) observaron que el mejor desarrollo aparece cuando la estimulación se efectúa 48 h antes de la aspiración. *Chaubal et al.* (3) realizaron un estudio comparativo entre sistemas de OPU con y sin estimulación hormonal, concluyendo que a la administración de FSH y de OPU 48 h más tarde, fue el mejor protocolo en base a respuesta folicular, recuperación de ovocitos y producción de embriones.

## **2.5. OVUM PICK UP**

### **2.5.1. Generalidades**

Después de desarrollar una técnica transvaginal guiada por ultrasonografía a partir de la reproducción humana, numerosos investigadores en la década de los años 90 comenzaron a usar la *Ovum pick-up* (OPU) rutinariamente en la reproducción asistida veterinaria (74) como método de recuperación de ovocitos para la producción de embriones *in vitro* (79).

Este procedimiento no invasivo y repetible no afecta el estado productivo, reproductivo ni compromete la fertilidad futura de las donantes. Permitiendo utilizar vacas adultas en diversos estados fisiológicos: cíclicas, acíclicas, primer tercio de



gestación, vacas que no responden a la estimulación hormonal y animales viejos con problemas reproductivos (80).

El éxito de la OPU dependerá de aspectos técnicos sobre la geometría de la aguja de aspiración y la presión de vacío, con lo que se ha conseguido mejorar la calidad de los ovocitos recogidos reduciendo el número de ovocitos denudados (81) y a aspectos biológicos como el momento del ciclo estral, raza, estimulación hormonal, edad y estado fisiológico de la donante (41).

### **2.5.2. Frecuencia de OPU**

Hasta hace poco tiempo la OPU era realizada generalmente en momentos aleatorios del ciclo estral, sin embargo, la creciente necesidad de mejorar la eficiencia de la técnica, de modo que se puedan obtener mayor y mejor calidad de ovocitos apunta hacia el empleo de protocolos previos a la aspiración, pudiendo tener una frecuencia de una o dos veces por semana (82, 83).

La administración exógena de gonadotropinas con OPU se ha convertido en el método preferido para aumentar el número de folículos disponibles por aspiración (84). Es posible obtener alrededor de 4 - 5 ovocitos por sesión sin estimulación ovárica, mientras que, con la adición de FSH se llega a recuperar 15 ovocitos por cada donante (83).

La superovulación actualmente es la herramienta más usada para multiplicar el número de folículos disponibles para la aspiración folicular, aunque presenta grandes variaciones dependiendo de la fase del crecimiento folicular, siendo el inicio de la onda el momento más favorable para la recuperación, ya como mencionan De Rover *et al.*, (74) más folículos resultan en más ovocitos.

Ampliar el rendimiento de ovocitos y embriones en un intervalo limitado de tiempo es obviamente un clave para la aplicación exitosa de técnicas de reproducción asistida, pues acelera los procesos de selección (85). Sin embargo, el aumento en la frecuencia de aspiración, desvalora la calidad y reduce la cantidad de ovocitos recuperados (81).

Chaubal *et al.* (3) sugieren un intervalo de 7 días o más entre sesiones de OPU pues permite el desarrollo de un folículo dominante y que probablemente con la obtención



cada 3 o 4 días, ejerza una influencia perjudicial sobre los ovocitos recuperados. Estos ovocitos son reportados a ser de menor calidad, razón para una tasa de desarrollo embrionario inferior (74, 84).

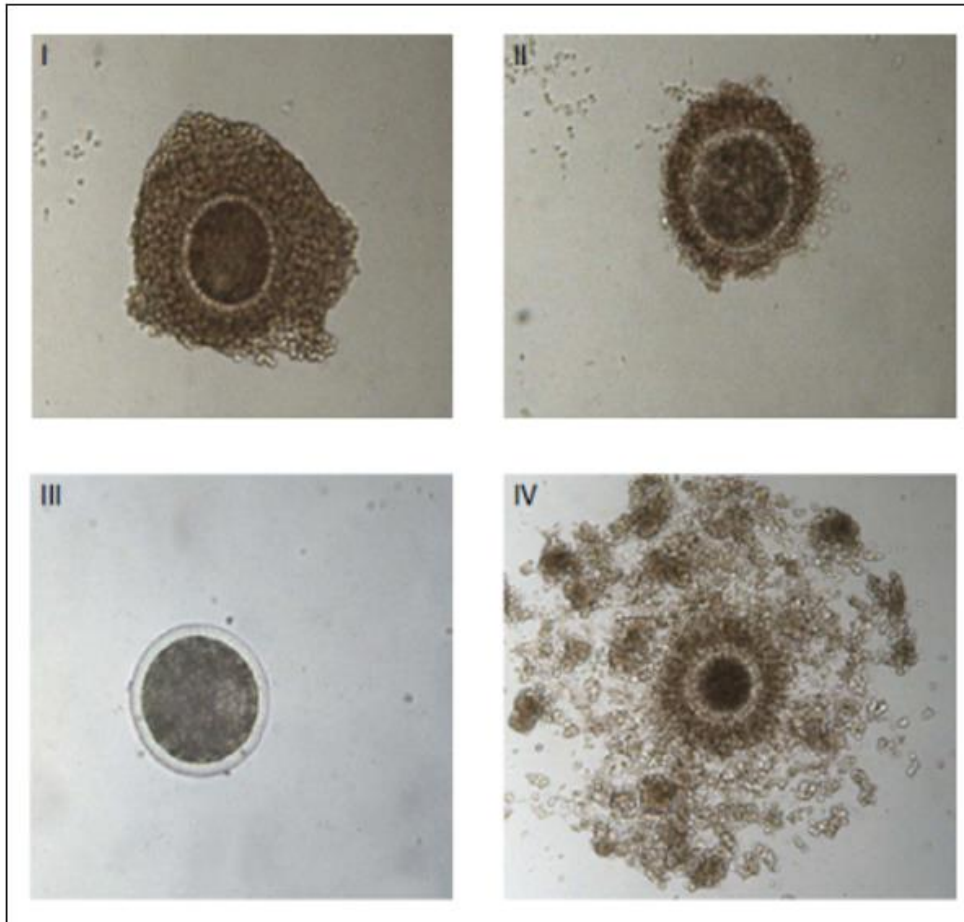
## 2.6. CLASIFICACIÓN COMPLEJOS CUMULUS OVOCITOS

Para la producción *in vitro* de embriones, la eficiencia del método de recolección y la clasificación de los ovocitos son un prerrequisito. Anteriormente se describió el método de recolección a emplearse en este estudio, para la clasificación morfológica de los ovocitos se toma en cuenta el estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cumulus (86)(87).

Las células del cumulus son un complejo metabólico y modulador del efecto de las hormonas y factores de crecimiento, durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. Estudios han demostrado que la calidad del complejo cumulus ovocito (COC), es decir el número de capas de células del cumulus influye directamente en el proceso de maduración (83).

Esto puede estar influenciado por el método de recolección de los ovocitos o por factores externos como: la manipulación, el tiempo de traslado y la temperatura de almacenamiento de los ovocitos recuperados (83). Se reporta que los ovocitos pueden permanecer a temperatura de 30° a 37° C durante 8 horas sin llegar a afectar su calidad (88).

Las categorías de clasificación varían en número según varios autores, siendo el principal criterio valorar la competencia para el desarrollo embrionario. Por lo tanto, los ovocitos se pueden clasificar morfológicamente según los criterios antes mencionados; tipo A corresponde a un ovocito con células del cumulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples del cumulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C se caracteriza por tener un cumulus denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras; el tipo D tiene el cumulus con células expandidas, un citoplasma irregular y con zonas oscuras (86).



**Figura 4:** Imágenes microscópicas. **I:** ovocito tipo A, **II:** ovocito tipo B, **III:** ovocito tipo C, **IV:** ovocito tipo D. **Fuente:** (87)

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Materiales biológicos

- Hormonas
  - FSH-LH (Pluset<sup>®</sup>)
  - GnRH (Fertagyl<sup>®</sup>)
  - Benzoato de estradiol (Grafoleón NF)
  - Prostaglandina (Lutaprost<sup>®</sup> 250)
- Vaquillas Holstein mestizas

##### 3.1.2. Materiales químicos

- Gel lubricante
- Alcohol 70%
- Medio de recolección PBS (VIGRO<sup>®</sup> Complete Flush)
- Lidocaína (ROXICAINA<sup>®</sup> 2%)
- Xilacina (Dormi-XYL<sup>®</sup> 2)
- Implantes de progesterona (DIB<sup>®</sup> 0.5g)
- Heparina (HEPARINA SÓDICA 1000 UI/ml, 5 ml)

##### 3.1.3. Materiales de campo

- Jeringas de 3, 5, 10 ml.
- Guantes de inspección y chequeo ginecológico
- Parches colorimétricos para detección de celo
- Overol
- Recipientes
- Toallas desechables
- Sustancias Jabonosas
- Dispositivo para insertar los implantes de progesterona
- Aguja Desechables 18G
- Tubos Falcon<sup>™</sup> 50 ml





- Equipo de ultrasonido ALOKA® ProSound2 Vet
- Transductor sectorial
- Porta sonda de ultrasonido
- Bomba de Aspiración
- Sistema de Guía de Aguja con aguja larga desechable 18G
- Set de mangueras

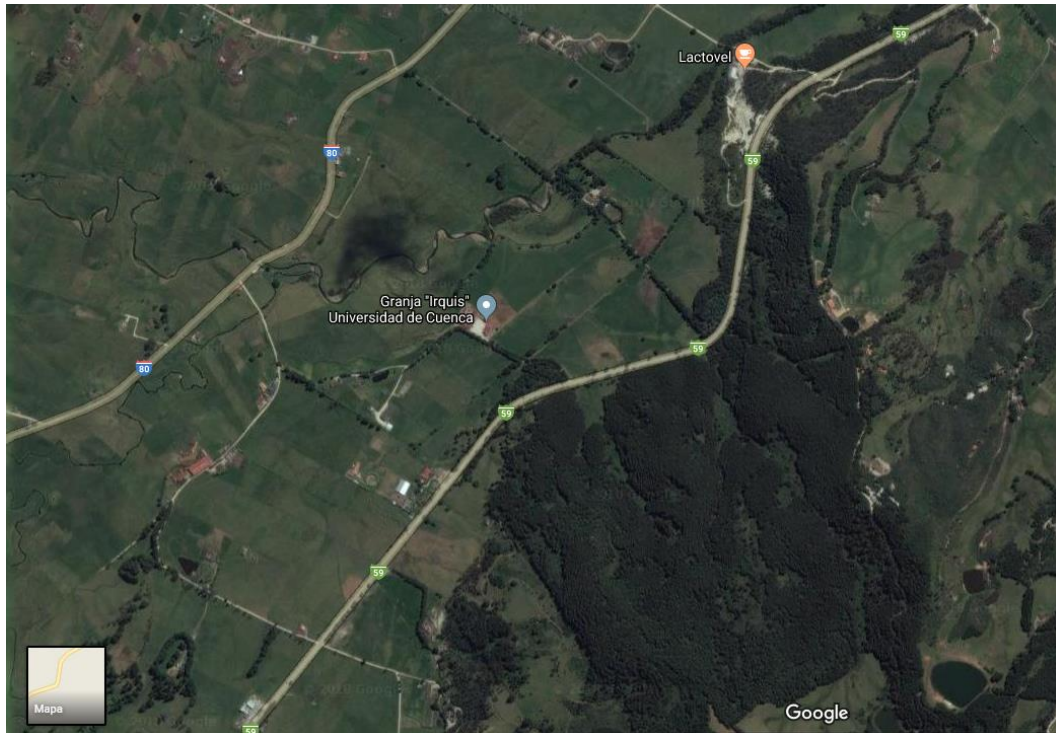
#### **3.1.4. Materiales de laboratorio**

- Micropipetas
- Capilares
- Pipetas automáticas
- Puntas de pipetas automáticas
- Placas petri cuadrículadas
- Estéreo microscopio
- Filtro EMCON (EmSafe, Minitube)
- Baño María
- Platina de calefacción

### **3.2. METODOLOGÍA**

#### **3.2.1. Área de estudio**

El estudio se llevó a cabo entre los meses de agosto y octubre del 2018 en la Granja Experimental "IRQUIS", de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, ubicada en Victoria del Portete, Azuay (3°04'49.1"S 79°04'31.6"O), a una altitud de 2 671 m.s.n.m., cuya precipitación pluvial promedio anual es de 1 078.05 mm y temperaturas que oscilan entre 7 a 12°C.



**Figura 5:** Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Experimental "IRQUIS" de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. **Fuente:** Google Maps, 2018.

### 3.2.2. Unidades experimentales

Fueron destinadas para el estudio un total de 9 vaquillas Holstein mestizas que ponderaban un peso promedio de  $427.7 \pm 23.04$  kg, una condición corporal de  $2.7 \pm 0.09$  en una escala de 1 a 5 y una edad promedio de  $26.7 \pm 1.45$  meses, las cuales estaban libre de enfermedades o anomalías en su sistema reproductivo y no gestantes.

Durante el transcurso del experimento los animales se mantuvieron en un mismo grupo, alimentándose con una mezcla de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) más vegetación de la zona; además, tuvieron disponibilidad *ad libitum* de agua y se suplementaron con sales minerales en una dosis de 100 g/animal (Tabla 1), más 2.5 Kg/animal de alimento concentrado (Tabla 2) los días planificados para la realización de las maniobras en comederos individuales ubicados en el establo.

**Tabla 1:** Composición nutricional Sal mineral.

Cada 100g contiene como mínimo	
Componente	Cantidad
Fósforo	2 g
Calcio	14 g
Magnesio	0.100 g
Zinc	0.160 g
Yodo	0.020 g
Cobalto	0.001 g
Potasio	0.001 g
Manganeso	0.002 g
Cobre	0.200 g
Azufre	0.100 g
Sodio	14 g
Cloro	17 g
Hierro	0.100 g
Selenio	0.0002 g
Metionina	Trazas
Lisina	Trazas
Zinc Orgánico	Trazas
Fitasa	Trazas

Para realizar el trabajo se tuvo presente la normativa del código sanitario para animales terrestres, capítulo 7.8 “Utilización de animales en la investigación y educación” de la Organización Mundial de Sanidad Animal (89), el cual permite asegurar el bienestar de los animales.

**Tabla 2:** Composición del alimento concentrado.

Cada 1000g contiene	
Ingrediente	Cantidad
Tamo de avena	381 g
Tamo de trigo	286 g
Maíz molido	286 g
Soya	48 g
Melaza	

### 3.2.3. Manejo preexperimental

Para seleccionar las vaquillas se comprobó previamente el estado sanitario del aparato reproductivo mediante palpación transrectal, exámenes ecográficos y exámenes vaginoscópicos.

Una vez seleccionadas se conformaron aleatoriamente tres grupos compuestos por tres vaquillas cada uno, los cuales estuvieron sujetos a tres tratamientos con tres repeticiones (3 animales/repeticón). En el transcurso del experimento se alternó cada grupo de vaquillas en cada tratamiento con el fin de que todas fueran incluidas en cada uno de los grupos experimentales del estudio (Tabla 3).

### 3.2.4. Tratamientos

Los tratamientos tuvieron como propósito reiniciar la onda folicular mediante tres protocolos, uno mecánico y dos farmacológicos:

- **Tratamiento 1:** consistió en la ablación de los folículos mayores a 5 mm, adoptando la metodología descrita por Chaubal et al. (3)
- **Tratamiento 2:** administración intramuscular de 0,25 mg de Gonadorelina (Fertagyl®, GnRH).
- **Tratamiento 3:** aplicación intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (Grafoleón NF).

**Tabla 3:** Conformación de grupos experimentales y repeticiones.

	PRIMERA REPETICIÓN			SEGUNDA REPETICIÓN			TERCERA REPETICIÓN		
TRATAMIENTO 1	V 1	V 2	V 3	V 4	V 5	V 6	V 7	V 8	V 9
TRATAMIENTO 2	V 4	V 5	V 6	V 7	V 8	V 9	V 1	V 2	V 3
TRATAMIENTO 3	V 7	V 8	V 9	V 1	V 2	V 3	V 4	V 5	V 6

\*V= Vaquilla

**Grupo 1=** V1 V2 V3

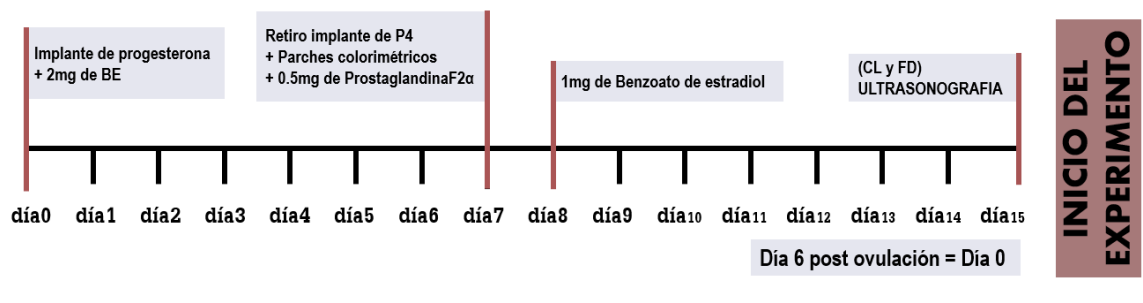
**Grupo 2=** V4 V5 V6

**Grupo 3=** V7 V8 V9

### 3.2.5. Sincronización

El ciclo estral de las vaquillas fue sincronizado con un protocolo estándar previo al inicio de cada repetición, para que exista homogeneidad de las fases del ciclo estral entre vaquillas.

- Día 0: inserción del implante de progesterona (DIB<sup>®</sup> 0,5 g), más 2 mg de benzoato de estradiol (Grafoleón NF), IM.
- Día 7: retiro del implante + 0.5 mg de prostaglandina F2 $\alpha$  (Lutaprost<sup>®</sup> 250), IM, además, se adhirió un parche colorimétrico para facilitar la detección de celo en la región lumbosacra.
- Día 8: 1 mg de benzoato de estradiol (Grafoleón NF), IM.
- Día 10: verificación ultrasonográfica de la ovulación.
- Día 15: (día 6 post celo) mediante ultrasonografía se verificó la presencia de cuerpo lúteo (CL) y folículo dominante (FD). Este día se consideró como día cero y se iniciaron los tratamientos. Únicamente los animales que presentaron CL y FD fueron considerados para el experimento.



**Figura 6:** Ilustración del protocolo de sincronización pre-experimental. **Fuente:** Autores.

### 3.2.6. Inicio de tratamientos

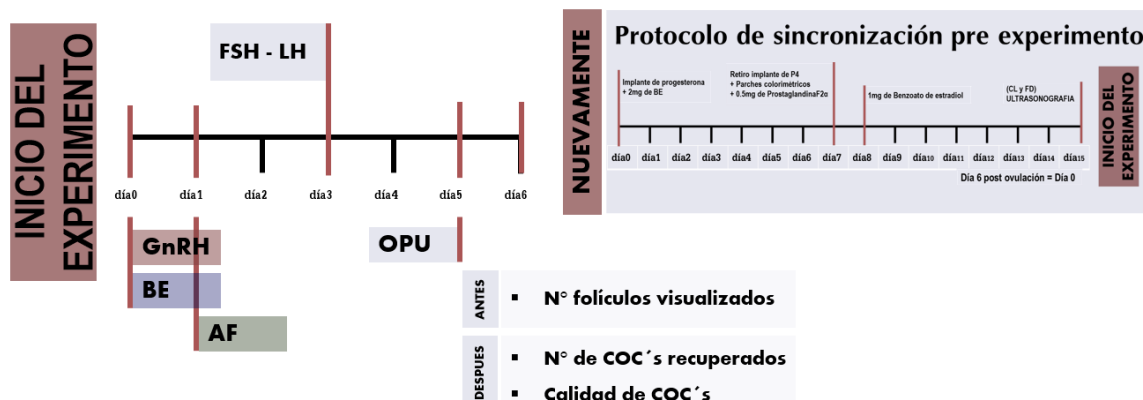
Para poder realizar el OPU el mismo día en los tres tratamientos se estableció un protocolo, en el cual el día 6 post celo, que de aquí en adelante fue denominado día 0, se aplicó una dosis IM de 0,25 mg de GnRH (Fertagyl<sup>®</sup>, tratamiento 2) y 2 mg de BE, IM (Grafoleón NF, tratamiento 3) según el tratamiento (grupos 2 y 3), y 24 horas

más tarde (día 1), se realizó la ablación de todos los folículos >5 mm a las vaquillas del grupo 1. De igual manera se procedió con las dos repeticiones restantes.

### 3.2.7. Estimulación ovárica

A las 72 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos farmacológicos (GnRH, grupo 2 y BE, grupo 3), y 48 horas de la ablación folicular (grupo 1) se administró una dosis IM de 500 UI de FSH-LH (Pluset®) a todos los grupos.

El tiempo transcurrido entre la aplicación de los tratamientos de reinicio de la onda folicular (ablación, GnRH y BE) y la estimulación ovárica con FSH-LH se estableció en base los hallazgos indicados por Supliguicha et al. (90), quienes evaluaron el efecto de la GnRH, el BE y la ablación folicular sobre el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular en vaconas Holstein mestizas en fase luteal, y reportaron el reinicio de onda mediante ablación folicular a los 2 días (48 h), mientras que al aplicarse GnRH o BE la aparición de la onda ocurrió a los 3 días (72 h).



**Figura 7:** Protocolo tratamientos. **Fuente:** Autores.

### 3.2.8. Procedimiento OPU

A las 48 horas después de la aplicación de la FSH-LH se realizó la maniobra de *Ovum* pick-up (OPU) en los tres tratamientos. Los animales se sometieron a tres sesiones (repeticiones) de OPU con intervalos de 21 días entre sesión, realizados por el mismo operador. Para la recuperación de ovocitos, las vaquillas fueron retenidas en una manga de contención e inmovilizadas individualmente gracias a un collarín. Luego fueron sedadas con Xilacina (Dormi-XYL® 2) a una dosis de 0,02 mg/kg, IM, seguido



del vaciamiento del contenido rectal y la asepsia de la zona perianal, para posteriormente realizar un bloqueo epidural con 0,3 mg/kg de Lidocaína (ROXICAINA® 2%).

Los folículos visualizados mediante ultrasonografía (ALOKA® ProSound2 Vet, Tokio, Japón) fueron cuantificados y registrados, para luego ser recuperados, siguiendo la metodología descrita por Chaubal et al. (7), con el empleo de un ecógrafo equipado con un transductor sectorial de 7.5 MHz, ensamblado a una sonda vaginal de plástico que contenía una guía de punción adaptable, con una aguja descartable de 18G × 1 ½", 1.20 × 40 mm, unida a una bomba de aspiración al vacío regulada a una presión de 65 mmHg.

El contenido folicular se recuperó a través de una tubería plástica de 1.1 mm de diámetro y 120 cm de longitud, conectada un tubo cónico Falcon™ de 50 ml (uno por tratamiento) que contenía 50 ml de Solución Buffer Fosfato, PBS (VIGRO® Complete Flush) atemperada a 37,7° Celsius y heparina sódica (HEPARINA SÓDICA 1000 UI/ml, 5 ml) en una dosis de 10 UI/ml. El vacío se ajustó a un caudal de flujo de 10-15 ml por minuto. El tubo cónico Falcon™ con el aspirado folicular se trasladó al laboratorio de Biotecnología de la Granja Experimental "IRQUIS" y los complejos cúmulo-ovocito (COC) recuperados, se lavaron y filtraron con un filtro EMCON (EmSafe, Minitube) en la misma solución atemperada que se usó durante la OPU.

### **3.2.9. Clasificación de los complejo cúmulo-ovocito**

Los COC's se colocaron en una placa Petri cuadrículada de 95 mm, se evaluaron morfológicamente con la ayuda de un estereoscopio y se clasificaron según el criterio de evaluación indicado por Hawk & Wall (91) y modificado por Samaniego et al. (87) quienes los agruparon finalmente en COC's aptos (tipo A y B) y no aptos (tipo C) (Tabla 4).

**Tabla 4:** Criterio de evaluación de la calidad de los COC's, según Hawk & Wall (91) y modificado por Samaniego et al. (87)

<i>Hawk &amp; Wall, 1994</i>			<i>Samaniego et al., 2017</i>
TIPO DE OVOCITO	CARACTERÍSTICAS DEL CUMULO	CARACTERÍSTICAS DEL OVOCITO	TIPO DE OVOCITO
Calidad buena (A)	Compacto, con varias capas de células, con granulosa adherida; el citoplasma se ve claramente	Homogéneo denso y finamente granulado.	Aptos (Tipo A y B)
Calidad intermedia (B)	Grueso, usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se ve claramente; cumulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida	Rango desde homogéneo denso y finamente granulado a granulado de tamaño moderado.	
Rechazados (C)	Parcial o completamente expandido con cumulo disperso, falta de células con presencia de material extracelular, cumulo descolorido (café claro o muy oscuro); corona radiata sin cumulo; ovocitos desnudos	Granulado grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes.	No aptos (Tipo C)

### 3.2.10. Variables de estudio

#### *Independientes:*

- Tratamientos de reinicio de la onda folicular.
- Repetición de sesión de OPU.

#### *Dependientes:*

- Número de folículos visualizados.
- Número de COC's recuperados.
- Calidad de COC's recuperados.





### **3.2.11. Análisis estadístico**

Los datos se procesaron con el programa estadístico SPSS versión 24. Las variables cuantitativas se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon con la prueba Tukey. Los valores porcentuales se analizaron con la prueba Chi-cuadrado. En ambos casos los valores de P menores a 0.05 se consideraron significantes.

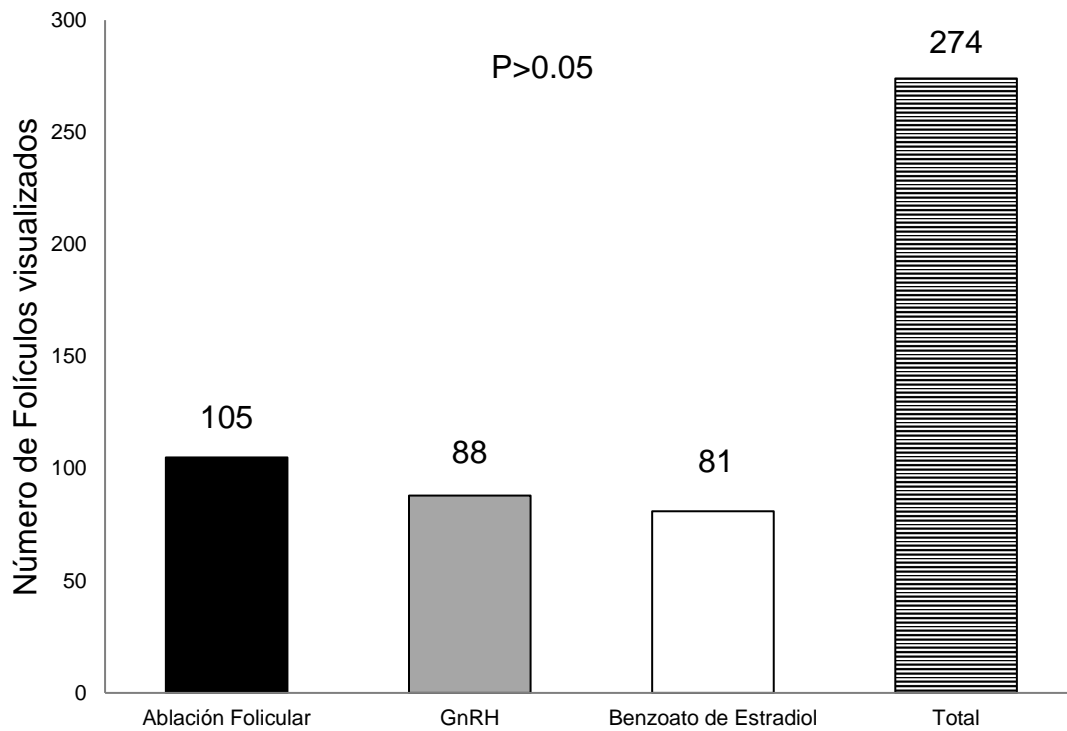
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Número de folículos visualizados

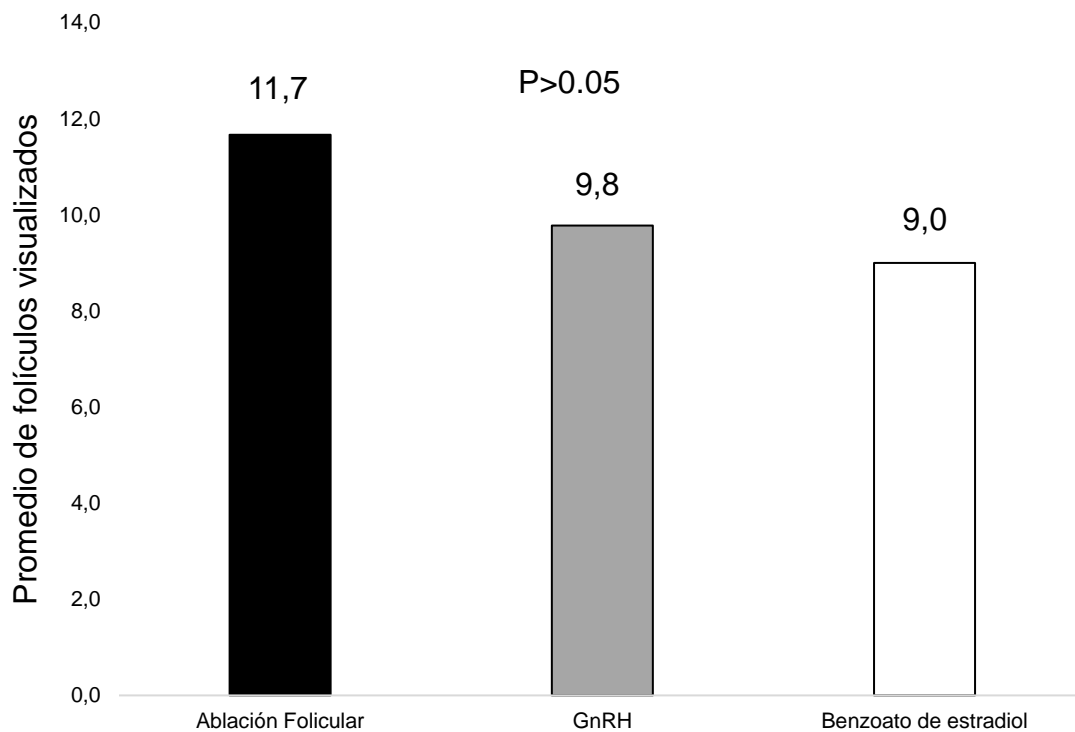
El objetivo de realizar estimulación ovárica en el momento de reinicio de una onda folicular, es aumentar el número de folículos disponibles para la recuperación de ovocitos mediante OPU, por ende, cosechar numerosas estructuras de calidad que puedan ser utilizadas para la PIV, tal como lo menciona Chaubal *et al.* (3). Estos resultados se podrían lograr mediante la asociación de FSH y LH tal como lo sugiere Restrepo *et al.* (71). Es así que, en la presente investigación al evaluar la totalidad de folículos visualizados por tratamiento durante el experimento (n=274), se observó que independientemente del método aplicado para inducir el reinicio de la onda folicular, las vaquillas estimuladas con FSH-LH (Pluset®), no presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P>0.05$ ), aunque existe una tendencia numérica a presentar un mayor número (105) de folículos por ablación folicular (tratamiento 1), en comparación a los 88 y 81 folículos observados en el tratamiento 2 (GnRH) y tratamiento 3 (BE), respectivamente (**Figura 8**).

De igual forma, no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) al evaluar el promedio de folículos visualizados en cada tratamiento en estudio (**Figura 9**). No obstante, prevaleció la predisposición numérica de presentar una mayor cantidad de folículos visualizados en el tratamiento 1 en comparación con el 2 y 3. Esto se podría interpretar que, a mayor número de folículos, mayor cantidad de ovocitos recuperados, tal como es corroborado por el estudio De Roover *et al.* (92).

También se evaluó el promedio de folículos visualizados en los ovarios derecho e izquierdo (**Figura 10**) indistintamente en los tres tratamientos, donde tampoco se encontró diferencias significativas ( $P>0.05$ ). Sin embargo, en los tratamientos 1 y 3 existió homogeneidad en el promedio de folículos visualizados en cada ovario (derecho vs izquierdo), a diferencia del tratamiento 2, donde se registró un promedio mayor de folículos en el ovario izquierdo (6,22) que en el derecho (4,78). Si bien esta diferencia no es relevante, considerar ampliar el número de animales en estudio, seguramente permitiría encontrar diferencias estadísticas en esta y otras variables estudiadas.



**Figura 8:** Total de folículos visualizados en cada tratamiento en todo el experimento.



**Figura 9:** Promedio total de folículos visualizados en cada vaquilla en los tres tratamientos en estudio. Prueba de Tukey al 5%

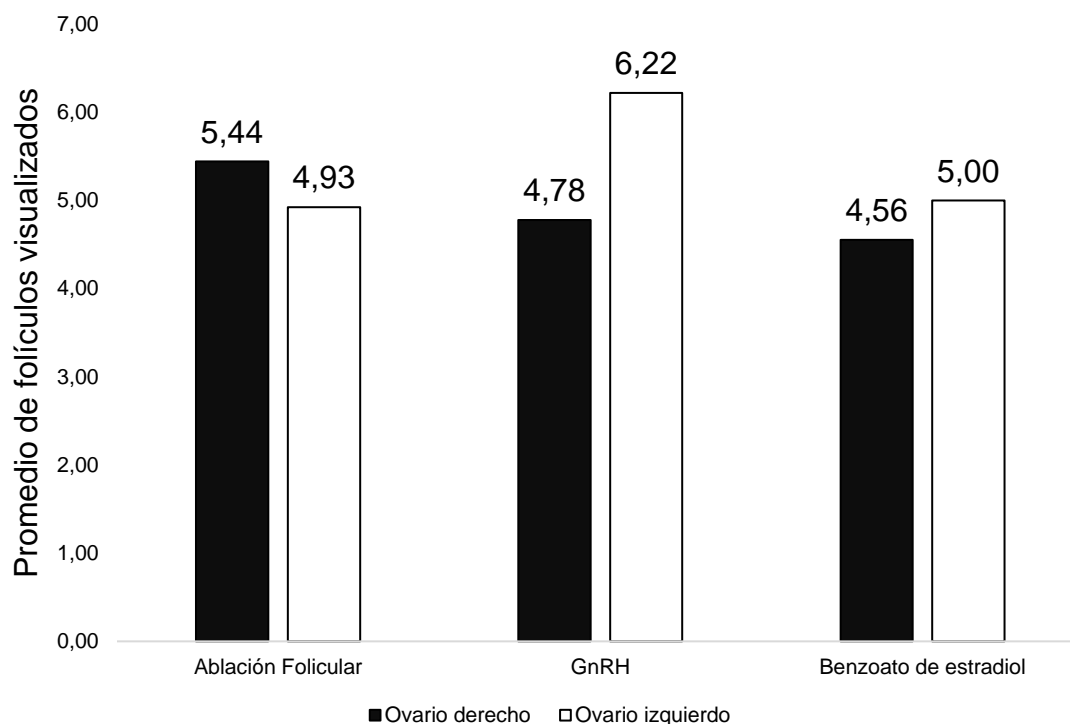


Los resultados obtenidos en la investigación, en cuanto al promedio de folículos visualizados por animal en los tratamientos en estudio ( $T_1=11.7$ ;  $T_2=9.8$ ;  $T_3=9.0$ ) mantienen un patrón de comportamiento similar a los obtenidos por Palubinskas *et al.* (93) quienes estimularon vacas usando dosis decrecientes (700 UI) de Pluset® durante 4 días. Luego de haber sido sincronizadas mediante un dispositivo de progesterona (1,38 g de P4, CIDR®), estos autores evaluaron el número de folículos presentes en cada ovario, y encontraron  $4.57 \pm 1.02$  en el ovario izquierdo  $3.74 \pm 0.38$  en el derecho, cifras equivalentes a las obtenidas en este estudio.

Otros autores, como Giraldo *et al.* (94), obtuvieron un rango entre 14 y 19 folículos por animal, resultado que está muy por encima de lo observado en el presente trabajo, considerándose que esta variación puede ser resultado del número de animales, raza y dosis de hormona empleados. En el mencionado estudio se utilizaron cuatro hembras bovinas F1 (Blanco Orejinegro BON x Holstein), que fueron sincronizadas con DIB® (1 g de P4), en un protocolo que consistió en la inserción del DIB® y la administración simultánea de 2 mg de BE (IM) en el día de inicio. Retiraron del DIB® y aplicaron 0.150 mg de D-cloprostenol (Prostal®, IM) siete días después (día 7), y de 1mg (IM) de BE 24 horas más tarde (día 8). Cuatro días después de la aparición del celo, en cada animal, realizaron la ablación del folículo dominante en cada animal, y luego de dos días iniciaron la aplicación de seis dosis de FSH (Folltropin® 50mg I.M.) administradas cada 12 horas. 48 horas de la última inyección de FSH, administraron una dosis de hCG (Chorulon®, 1500 UI. IV) antes de la OPU.

Asimismo, De Roover *et al.* (74) obtuvieron una media de  $14.9 \pm 9.9$  de folículos en su estudio. El promedio de folículos visualizados por García *et al.* (95) al usar GnRH ( $18.77 \pm 5.22$ ) y al realizar ablación ( $13.55 \pm 4.77$ ) después de la estimulación con 500 UI de FSH (Pluset®) fueron superiores a los promedios obtenidos en el presente estudio. Autores como Vieira *et al.* (96) obtuvieron un promedio de  $16.3 \pm 1.6$  folículos visualizados, cuando estimularon vaquillas Holstein con dosis decrecientes de Folltropin®-V (200 mg) en los días 4 y 5 después de la sincronización con benzoato de estradiol. Resultados similares a los descritos anteriormente obtuvieron Chaubal *et al.* (3), quienes estimularon vacas con 200 mg de FSH (Folltropin®-V, Bioniche Animal Health) divididas en dos dosis, 120 mg subcutánea y 80 mg intramuscular, obteniendo un promedio de  $16 \pm 5$  folículos visualizados por animal. Si bien los resultados obtenidos por los anteriores autores mencionados son superiores, podría

ser consecuencia de dos factores: vías y dosis de administración de la(s) hormona(s) usadas y raza de los animales empleadas en los estudios citados.



**Figura 10:** Promedio de folículos visualizados en el ovario derecho e izquierdo en cada vaquilla en los tres tratamientos en estudio. Prueba de Tukey al 5%

#### 4.2. Número de folículos visualizados por repetición

De acuerdo con los resultados de este estudio, independientemente del tratamiento no se obtuvieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), al compararse el número de folículos visualizados en cada repetición (**Figura 11**). Sin embargo, se observó una tendencia numérica a disminuir el número de folículos presentes conforme avanzó las repeticiones del estudio, debido quizás, a la disminución de los receptores hormonales o a la resistencia generada en los animales por el uso repetido de la hormona exógena empleada en los tratamientos (97).

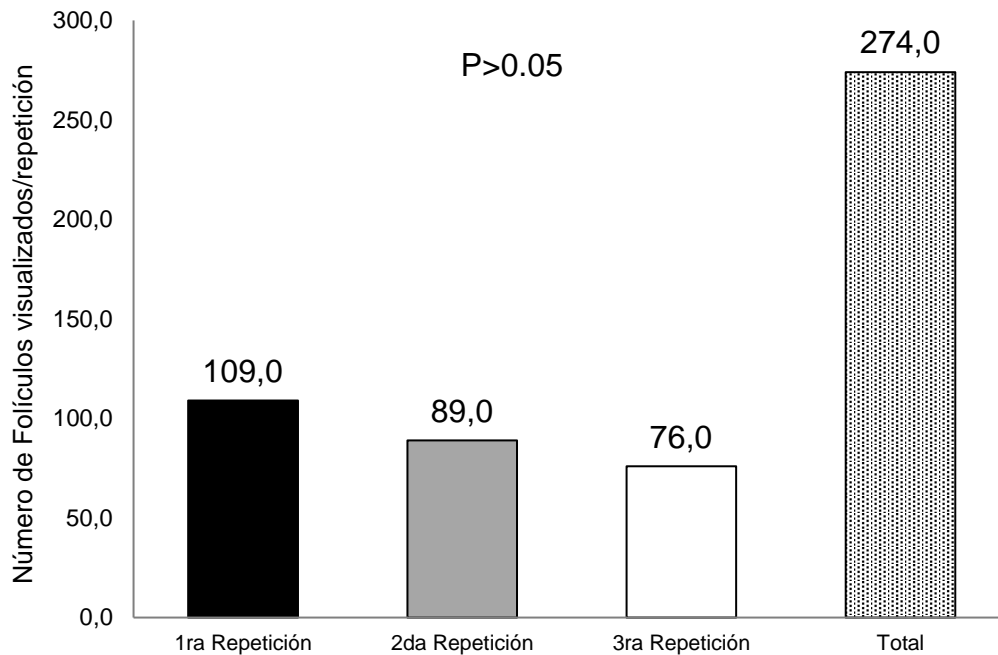
Algo semejante ocurre con los resultados expuestos donde tampoco se detectaron diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ) en el número de los folículos visualizados por tratamiento en cada repetición. A pesar de esto se hizo evidente que hubo mayor número de folículos en el tratamiento 1 que en los tratamientos 2 y 3, y esta tendencia



numérica se mantuvo hasta la segunda repetición, ya que en la tercera el tratamiento 1 fue superado en 4 folículos por el tratamiento 2 (**Figura 12**); además es notable la disminución conforme avanzan las repeticiones. Al analizar el comportamiento del tratamiento 2, se observó una clara disminución del número de folículos en la segunda repetición en comparación con la primera; no obstante, estos aumentan en la tercera repetición. Caso similar a lo presentado con el tratamiento 1 ocurrió en el tratamiento 3, el cual presentó una tendencia a disminuir el número de folículos mientras avanzaron las repeticiones.

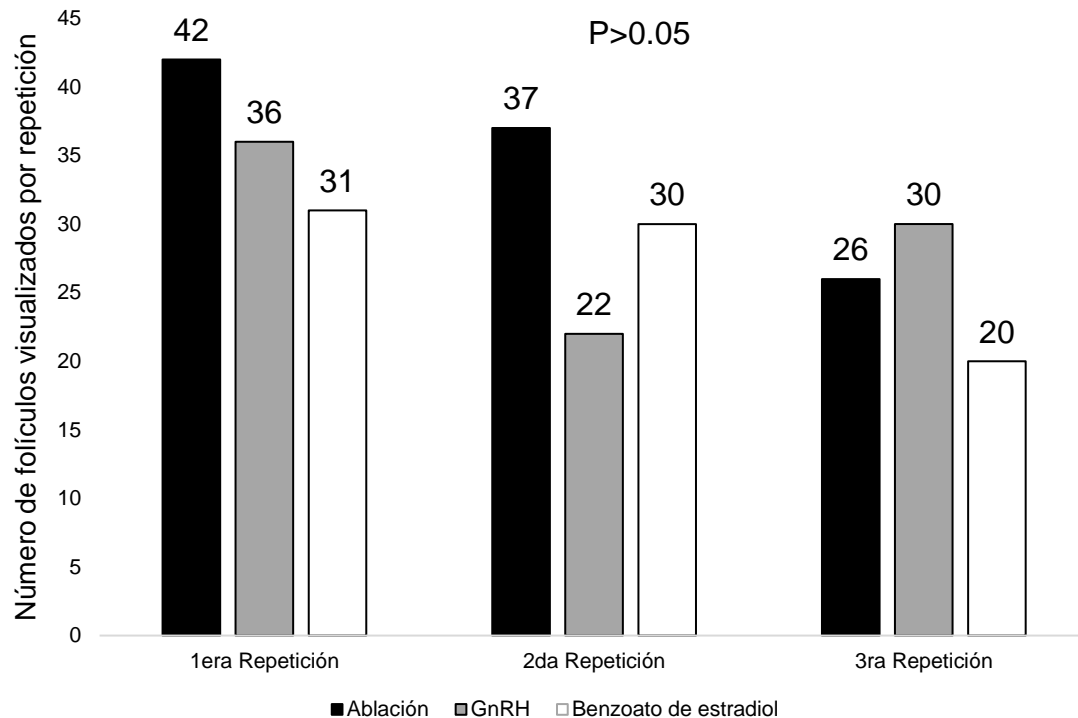
La mayoría de los investigadores coinciden en que la respuesta superovulatoria disminuye con los tratamientos sucesivos, lo que podría argumentar la disminución del número de folículos. Autores como Chaubal *et al.* (3) mencionan que un intervalo de 7 días entre sesiones permite el desarrollo de un folículo dominante que probablemente ejerce una influencia perjudicial sobre los ovocitos de folículos subordinados, estos ovocitos son reportados a ser de menor calidad y ya han pasado por la expansión del cumulus y atresia. A lo que recomiendan que las donantes deben tener un descanso de por lo menos dos ciclos estrales (36-42 días) entre cada superovulación para que no se vea afectado el número de folículos disponibles para OPU (98).

Se estima que los folículos pequeños crecen más lento, y se requieren dos ciclos de estro para que los folículos pre-antrales alcancen la etapa antral madura (98). Pero podría deberse también al tratamiento empleado, ya que Bo *et al.* (13), mencionaron que el empleo de métodos físicos para el reinicio de la onda folicular, genera inmediatamente un aumento en los niveles de FSH en 5 horas y la emergencia de una nueva onda de desarrollo 24 a 48 horas después de la eliminación de los folículos en cualquier fase del ciclo estral, lo que permite la realización del programa de superovulación en este periodo de tiempo.



**Figura 11:** Número total de folículos visualizados en cada repetición, sin considerar el tratamiento.

Sin embargo, García *et al.* (95) consideran que la ablación del folículo dominante mediante una punción ovárica adicional conlleva a un mayor estrés para los animales que podría influir en el desarrollo de folículos. Adams *et al.* (43) señalaron que el tratamiento con estradiol exógeno durante la fase lútea induce la desaparición del folículo dominante existente más no la ovulación. Así mismo Bo *et al.* (66) ratificaron que el benzoato de estradiol al suprimir la FSH y LH, induce la atresia folicular seguida de un rebote en la FSH, que estimula la aparición sincrónica de una nueva onda folicular. La administración de GnRH produce ovulación del folículo dominante en un 95% de los animales (99), reiniciando la onda folicular 1 a 2 días después de su aplicación (66). La respuesta superovulatoria sincronizando la onda folicular con GnRH es similares a la obtenida cuando la onda folicular es sincronizada con estradiol (61).



**Figura 12:** Número de folículos visualizados en cada repetición por tratamiento.

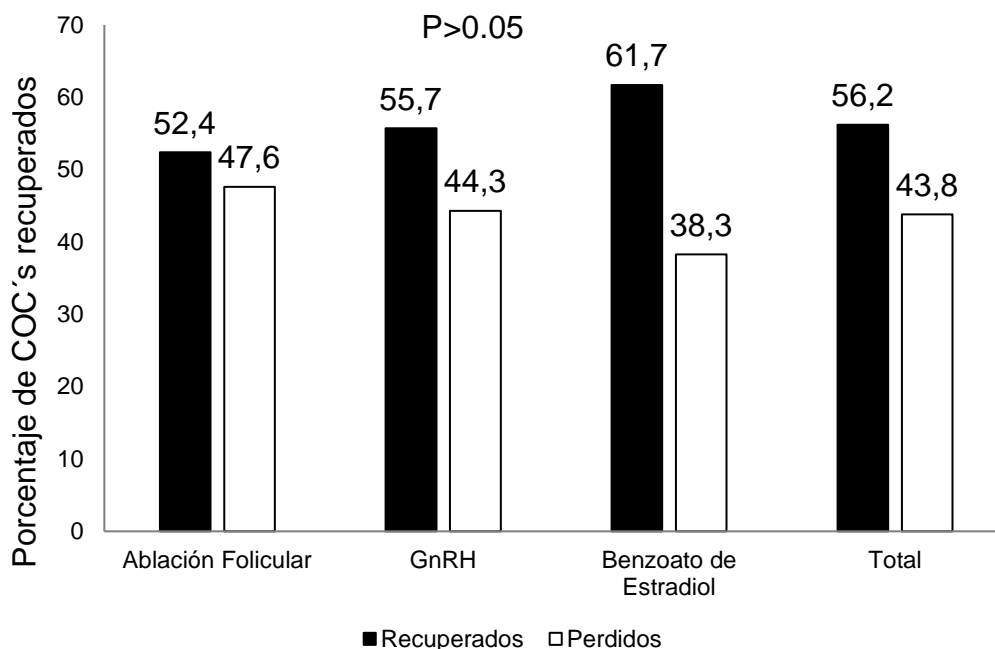
#### 4.3. Porcentaje de COC's recuperados

Chaubal *et al.* (3) recomendaron el uso de protocolos alternativos que permitan estimular los ovarios, aumentando el número de COC's aptos para PIV. Es así como, estimularon el desarrollo folicular empleando únicamente FSH y obtuvieron mayor cantidad de ovocitos. De Roover *et al.* (74) indicaron en su estudio que la estimulación con FSH-LH antes de OPU podría tener un efecto positivo en la competencia *in vitro* de desarrollo de ovocitos. Años después Ruiz *et al.* (80) corroboraron que la combinación FSH y LH mejoró el porcentaje de COC's para PIV, así como también indicaron que el uso solo de FSH produjo una asincronía en el crecimiento entre el folículo y el ovocito.

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que, al comparar estadísticamente los tratamientos, no se halló diferencia ( $P > 0,05$ ), aunque la estimulación ovárica con FSH-LH al momento de reinicio de la onda folicular inducida con benzoato de estradiol, permitió recuperar un porcentaje mayor de COC's (61,7%) con respecto a la ablación folicular (52,4%) y a la administración de GnRH (55,7%) (**Figura 13**).



Caso similar ocurre al evaluar el porcentaje de folículos recuperados en cada tratamiento por repetición, donde tampoco se evidenció diferencia significativa ( $P>0,05$ ) (**Figura 14**). Al analizar de forma individual, existió tendencia numérica pues en la primera repetición el tratamiento 3 presentó 30% más ovocitos recuperados con relación al tratamiento que le sigue o 1.9 y 1.7 veces mayor que en los tratamientos 1 y 2 respectivamente. El escenario de la segunda repetición es contrario a la primera, se observó un menor porcentaje de recuperación del tratamiento 3 (46.7%) en comparación a los 64.9% y 59.1% en los tratamientos 1 y 2, respectivamente. En la tercera repetición se presentó una situación distinta a las anteriores, en la que los porcentajes de recuperación fueron bastantes similares entre tratamientos.



**Figura 13:** Porcentaje de COC's recuperados en cada tratamiento. Prueba de Chi cuadrado 5%.

Los porcentajes de recuperación de COC's en la presente investigación fueron similares a los obtenidos por autores como Ruiz *et al.* (80) que obtuvieron un 56.7% de recuperación después de la sincronización de la onda folicular administrando 0.2 mg de GnRH, IM (día 0), seguido por la aplicación de 500 UI de FSH-LH, IM, 48h más tarde (día 2). Asimismo, Alvarado *et al.* (100) al utilizar cuatro vacas Holstein sometidas a veinte y cuatro sesiones de aspiración folicular, durante doce semanas,

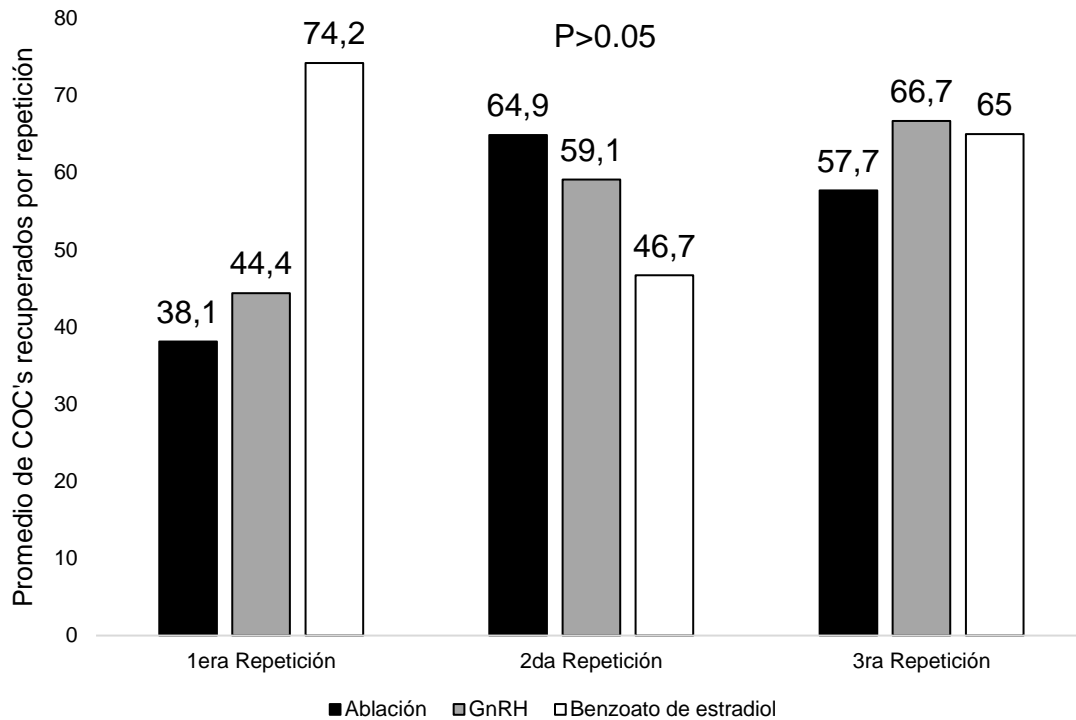


en dos sesiones por semana, lograron visualizar 14.9 folículos y recuperar 8.4 ovocitos, resultando una tasa de recuperación de 56.3%.

Samaniego (87) estimuló a vaquillas con Pluset® (FSH-LH) y realizó OPU 48h después, y logró un porcentaje de recuperación de COC's del 80.3%. De Roover *et al.* (74) obtuvieron un porcentaje de recuperación mayor y concluyeron, según los resultados de su estudio, que las tasas de recuperación en sesiones de OPU con vacas no estimuladas (57%), fue menor que en las estimuladas (79%) cada 2 semanas. Autores como Vieira *et al.* (96) estimulando vaquillas Holstein con dosis decrecientes de Folltropin®-V (200 mg) después de la sincronización con benzoato de estradiol, obtuvieron un porcentaje de 61.1% de COC's recuperados.

Por otra parte, Chasombat *et al.* (84) obtuvieron un promedio de  $15.73 \pm 1.03$  folículos luego de 72h de realizar estimulación ovárica una dosis única de 100 mg FSH-p en cuatro momentos distintos, después de la ablación folicular, con los cuales lograron una tasa de recuperación de COC's del 80.83%. Mientras que, Giraldo *et al.* (94) obtuvieron un promedio de siete COC's por animal recuperados por aspiración folicular con una tasa de recuperación de COC's aptos del 40%, solamente realizando estimulación con FSH y de 85.6% al emplear FSH-hCG como factor de estimulación ovárico. Asimismo García *et al.* (95), lograron porcentajes de recuperación de COC's por tratamiento de 63.31% y 63.93%, al reiniciar la onda folicular con GnRH y ablación del folículo dominante, respectivamente. Sin embargo, en los estudios citados en los que se utilizó estimulación ovárica (FSH; FSH-hCG) los folículos visualizados y COC's recuperados fueron mayores a los de la presente investigación.

El menor porcentaje de COC's recuperados en la presente investigación, denota problema de la técnica empleada (dosis única de FSH-LH); sin embargo, varios autores (91, 100, 101) han enfatizado que las diferencias en los resultados podrían ser explicados por el protocolo de estimulación utilizado, tipo de hormona o dosis administradas, la raza de los animales, el equipo usado para OPU, sin excluir la experiencia del operador y el sistema de manejo de los animales.



**Figura 14:** Porcentaje de COC's recuperado en cada tratamiento por repetición  
Prueba de Chi cuadrado 5%.

#### 4.4. Calidad de COC's recuperados

Los resultados encontrados en este estudio demostraron que la estimulación ovárica con FSH – LH (Pluset®) después de la ablación folicular, tuvo una tendencia numérica clara (no diferencia estadística) en el número de folículos con respecto a los otros dos tratamientos. El benzoato de estradiol demostró ser el tratamiento menos efectivo para estimular el desarrollo de folículos, mientras que, con la aplicación de GnRH se obtuvieron resultados aceptables, siendo la segunda mejor alternativa a la estimulación ovárica. Aun cuando existió una tendencia numérica del tratamiento 1 de estimular el desarrollo de mayor número de folículos, con este tratamiento se obtuvo el menor porcentaje de recuperación de ovocitos, siendo el tratamiento 3 el que logró el porcentaje más alto de recuperación. Asimismo, sin tener la mejor efectividad al compararse los tres tratamientos, el tratamiento 2 presentó un porcentaje de recuperación de COC's comparable a los mencionados por muchos autores.



La calidad del ovocito se puede definir como el conjunto de características que le confieren competencia para producir un blastocisto dentro de un sistema de producción *in vitro*. La eficiencia de la punción, basada en el número de ovocitos obtenidos en relación al número de folículos aspirados, varía según la raza de los animales, estado nutricional y la experiencia del operador. Lo valores de recuperación varían entre 50% y 60% (41). El objetivo más relevante fue probablemente la evaluación de la calidad de ovocitos obtenidos en cada tratamiento para emplearlos en la producción de embriones *in vitro*.

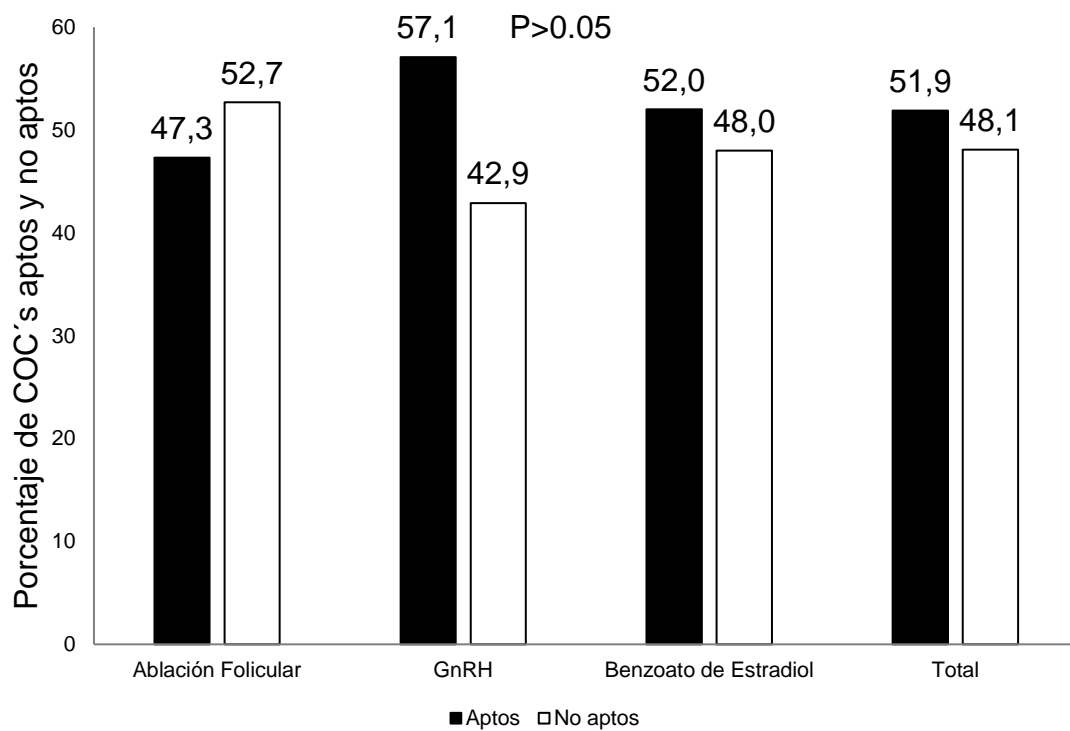
Es así que, al analizar el porcentaje de COC's recuperados en cada tratamiento (**Figura 15**), luego de ser clasificados como aptos y no aptos para la PIV, se determinó, que en los tres tratamientos el comportamiento de esta variable fue estadísticamente similar. No obstante, el uso de GnRH para estimular el reinicio de la onda folicular (tratamiento 2), permitió recuperar un 57,1% de COC's aptos en comparación con los tratamientos 1 y 3, en los que este porcentaje fue entre 5 y 10 puntos porcentuales menor.

Si bien al compararse los tratamientos en cada repetición no existió diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) al valorar el porcentaje de COC's recuperados clasificados como aptos y no aptos para PIV (**Figura 16**), es interesante puntualizar las variaciones que resultaron en cada repetición. Dentro de este marco de ideas, en la primera repetición se observó una clara superioridad al usarse GnRH (68.8%) como estimulante de la onda folicular en comparación a los tratamientos 1 (37.5%) y 3 (47.8%). Esta situación se revierte en la segunda repetición, pues en el grupo de GnRH se recuperaron entre 2 y 1.6 veces menos COC's aptos que en los tratamientos 1 (ablación) y 3 (benzoato de estradiol), respectivamente. No obstante, en las otras dos repeticiones estos resultados fueron bastante similares entre tratamientos.

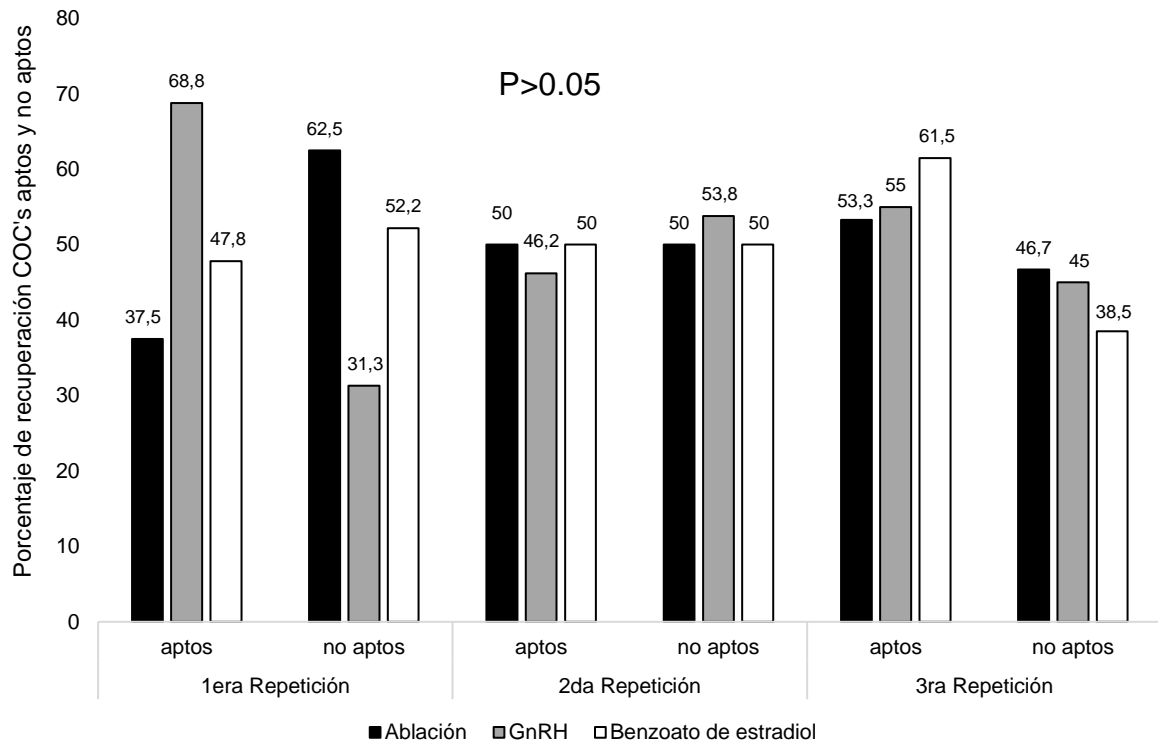
Al comparar la calidad de los COC's recuperados en el estudio con resultados obtenidos por otros autores, se hizo evidente que el porcentaje de recuperación de COC's aptos (51.9%) fue menor que el obtenido por Samaniego (87) (65.3%) 48 horas después de la estimulación con FSH-LH, y al de De Roover *et al.* (74), quienes lograron un porcentaje de 79%.

Sin embargo, otros autores obtuvieron resultados semejantes a los logrados en este estudio, por ejemplo, Ruiz *et al.* (80) eliminando el folículo dominante con GnRH,

seguido de la estimulación ovárica con FSH-LH 48h más tarde, consiguieron un porcentaje de 53% de COC's aptos. Mientras que García *et al.* (95) y Chasombat *et al.* (84), alcanzaron porcentajes de recuperación de COC's aptos 48.94% y 44.27% respectivamente, los cuales fueron menores a los obtenidos en esta investigación.



**Figura 15:** Porcentaje de COC's recuperados clasificados como aptos y no aptos para la PIV, en cada tratamiento. Prueba de Chi cuadrado 5%



**Figura 16:** Porcentaje de COC's recuperados clasificados como aptos y no aptos para la PIV, en cada tratamiento por repetición. Prueba de Chi cuadrado 5%



## 5. CONCLUSIONES

- Se determinó que la aplicación de FSH-LH (Pluset®) en una sola dosis (500 UI, IM) en el momento exacto del reinicio de la onda folicular, con los tres tratamientos (ablación folicular, GnRH y benzoato de estradiol), probados en este estudio, permitió obtener un número similar de folículos (>5mm) disponibles para ser aspirados por *Ovum pick-up*.
- La cantidad de complejos cumulo-ovocito obtenidos por OPU, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH, fue similar entre tratamientos y comparable al obtenido en otros estudios a nivel internacional cuando utilizaron estos tipos de hormonas en una dosis única. Sin embargo, el número de COC's estuvo por debajo de la respuesta descrita en otros reportes en los que utilizaron varias dosis de FSH únicamente.
- El porcentaje de COC's aptos para la producción de embriones *in vitro* se encuentran dentro de los parámetros establecidos por varios autores al utilizar estimulación ovárica, con FSH o FSH combinada con LH (Pluset®).



## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. International Embryo Transfer Society. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. 2016;16. Available from: [http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_Report\\_2016\\_v2.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2016_v2.pdf)
2. International Embryo Transfer Society. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. 2015;1–10. Available from: [https://www.iets.org/pdf/comm\\_data/December2015.pdf](https://www.iets.org/pdf/comm_data/December2015.pdf)
3. Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PEJ, 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* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2018 Apr 3];65(8):1631–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16243385>
4. Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo V, Di R, Campanile G, Antonio G, et al. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* [Internet]. 2003;59. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02011706?via%3Dihub>
5. Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. *Biol Reprod* [Internet]. 2001;65(5):1403–9. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod65.5.1403>
6. Sartori R, Barros CM. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2011;124(3–4):244–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432011000352>
7. Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Júnior JRS, Souza AH, Madureira EH, et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* [Internet]. 2008;69(7):852–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08000095?via%3Dihub>
8. Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, et al. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* [Internet]. 2010;74(8):1349–55. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10003080?via%3Dihub>
9. Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches B V., Rubin KCP, et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 2011;75(9):1640–6.
10. Gimenes LU, Ferraz ML, Fantinato-Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Sá Filho MF, et al. The interval between the emergence of pharmacologically





- synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect invitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology* [Internet]. 2015;83(3):385–93. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14005391?via%3Dihub>
11. Ortega V., Dután J., Ayala L., Rodas E., Nieto P., Vázquez J., et al. Caracterización productiva de las ganaderías en los cantones occidentales de la provincia del Azuay. *Maskana, Producción Animal* [Internet]. 2017;145–7. Available from: <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1510/1195>
  12. Berfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* [Internet]. 1994;42(6):895–907. Available from: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(05\)80071-8/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(05)80071-8/abstract)
  13. Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 1995;39(3):193–204. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843209501389H>
  14. Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*. 2000;53(6):1239–50.
  15. Ledur F. Control del Desarrollo Folicular para la obtención de COCs por aspiración guiada por ultrasonografía [Internet]. Instituto de Reproducción Animal Córdoba; 2013. Available from: <http://www.iracbiogen.com/admin/biblioteca/documentos/TesisFelipeonganatto.pdf>
  16. Avila L. Técnicas bovinométricas para determinar la capacidad reproductiva, productiva de hembras lecheras de la raza Holstein de la región austral. Universidad del Azuay; 2006.
  17. Inatec. Reproducción animal. Instituto Nacional Tecnológico, Dirección General de Formación Profesional. 2016. p. 100.
  18. Porrás A, Páramo R. Manual de Prácticas de Reproducción Animal. México UNA de, editor. México; 2009. 246 p.
  19. Kelly G. Caracterización de las alteraciones del aparato reproductor de la hembra bovina a nivel de camal. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2014.
  20. Nuttinck F, Mermillod P, Massip A, Dessy F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: A preliminary study. *Theriogenology* [Internet]. 1993;39(4):811–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9390420A>
  21. Peña M, Góngora A, Estrada J. Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. *MVZ Córdoba* [Internet]. 2007;12:942–54. Available



- from: <http://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/revistamvz/article/view/439>
22. Sánchez L. Caracterización de las alteraciones macroscópicas del aparato genital de hembras bovinas faenadas en el camal frigorífico municipal de Ambato. Universidad Técnica de Ambato; 2014.
  23. Rippe C. El Ciclo Estral. Dairy Cattle Reprod Conf [Internet]. 2009;(March 2015):111–6. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/265116863>
  24. Guáqueta H. Ciclo Estral: Fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia (Universidad Nacional de Colombia) [Internet]. 2009;22. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/17895/1/13621-41296-1-PB.pdf>
  25. Rivadeneira V. Ciclo Estral Bovino. In: Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos [Internet]. Lima: Siriv; 2013. Available from: <https://es.scribd.com/document/209275907/Articulo-Ciclo-Estral-Bovino-Rivadeneira>
  26. Colazo M., Mapletoft RJ. Fisiología del ciclo estral bovino. Revista Ciencias Veterinarias [Internet]. 2014;16:31–46. Available from: <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/v16n2a03colazo.pdf>
  27. Hernández J. Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros [Internet]. Coyoacán, México D.F; 2012. 1-176 p. Available from: [http://www.ammveb.net/reproduccion/Fisiologia\\_clinica.pdf](http://www.ammveb.net/reproduccion/Fisiologia_clinica.pdf)
  28. Gigli I, Russo A, Agüero A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericano. InVet [Internet]. 2006;8(1):183–204. Available from: <http://www.fvet.uba.ar/fcvanterior/publicaciones/archivos/Volumen8N1/gili8.pdf>
  29. Fernández M. El ciclo estral de la vaca. Diagnostico fotografico. Zaragoza, España: Servet; 2008. 284 p.
  30. Gonella A, Atuesta J, Bernal S, Chacón L. Overview of the production of bovine embryos in vitro. Investig Agrar y Ambient [Internet]. 2013;4(1):65–80. Available from: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/39-generalidades\\_de\\_la\\_produccion.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/39-generalidades_de_la_produccion.pdf)
  31. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. Biol Reprod [Internet]. 1996 Dec [cited 2018 Apr 3];55(6):1187–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8949873>
  32. Rajamahendran R, Taylor C. Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. Anim Reprod Sci [Internet]. 1990;22(3):171–80. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843209090058N>
  33. Enjoy DED, Cabrera P, Vivas I, Thaís D. Dinámica Folicular ovárica Durante el ciclo estral en vacas Brahman. Prod Anim [Internet]. 2012;39–47. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=373139079005>



34. Filipiak Y, Viqueira M, Bielli A. prepuberal en bovinos Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle Resumen Introducción. Veterinaria (Montevideo) [Internet]. 2016;52(202):14–22. Available from: [https://virtual.ucundinamarca.edu.co/moodle/pluginfile.php/142685/mod\\_resource/content/1/Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle.pdf](https://virtual.ucundinamarca.edu.co/moodle/pluginfile.php/142685/mod_resource/content/1/Development%20and%20follicular%20dynamics%20from%20fetal%20life%20until%20puberty%20in%20cattle.pdf)
35. Rajakoski E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. Obstet Gynecol Surv. 1960;15(6):836–8.
36. Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. Theriogenology [Internet]. 1988;29(1):21–37. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X88900295>
37. Viana JHM, Ferreira ADM, De Sá WF, Camargo LSDA. Follicular dynamics in zebu cattle. Pesqui Agropecu Bras [Internet]. 2000;35(12):2501–9. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2000001200021](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2000001200021)
38. Borges AM, Torres CAA, Rocha VR, Ruas JRM, Gioso MM, Fonseca JF, et al. Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. Arq Bras Med Vet e Zootec [Internet]. 2004;56(3):346–54. Available from: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/14514>
39. Goodman AL, Hodgen GD. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. Recent Prog Horm Res [Internet]. 1983 [cited 2018 Nov 27];39:1–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6415767>
40. Del Valle Díaz T. Dinámica folicular ovárica durante el ciclo estral en vacas doble propósito. Desarro Sosten la Ganad doble propósito [Internet]. 2008;547–52. Available from: [http://www.avpa.ula.ve/libro\\_desarrollosost/pdf/capitulo\\_44.pdf](http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_44.pdf)
41. Palma G. Biotecnología de la Reproducción Ciencia, Tecnología y Sociedad. In: Biotecnología de la Reproducción. 2008. p. 48.
42. Espinoza-Villavicencio JL, Pérez RO, Espinosa AP, Méndez JV, Flores CFA. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos. Interciencia [Internet]. 2007;32(2):93–9. Available from: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007000200006](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000200006)
43. Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. Theriogenology [Internet]. 2008;69(1):72–80. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X07005961>
44. López Barbella S. Prostaglandina F2a y la reproducción de los bovinos. In: González Stagnaro C, editor. Reproducción Bovina [Internet]. Fundación. Maracaibo: Fundación Grupo de Investigación de la Reproducción Animal en la Región Zuliana; 2001. Available from: [http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros\\_online/libro\\_reproduccionbovina/cap1](http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/libro_reproduccionbovina/cap1)



## 8.PDF

45. Bó GA, Moreno D, Cutaia LE, Caccia M, Tríbulo RJ, Tríbulo HE. Transferencia de embriones a tiempo fijo: Tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. 2004;(January):17.
46. Colazo M, Mapletoft R, Martinez M, Kastelic J. El uso de tratamientos hormonales para sincronizar el celo y la ovulación en vaquillonas. *Cienc Vet* [Internet]. 2007;(1515–1883):4–19. Available from: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=f63f527f-66c2-4920-9b74-cc88a43b5acc%40sessionmgr103>
47. Baruselli PS, Marques MO, Vieira LM, Konrad JL, Crudeli GA. Aplicación de biotecnologías para una mayor producción de terneros. *Rev Vet* [Internet]. 2015;26(2):154–9. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/revet/v26n2/v26n2a14.pdf>
48. Becaluba F. Métodos De Sincronización De Celos En Bovinos. *Prod Anim* [Internet]. 2006;2–4. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/revet/v26n2/v26n2a14.pdf>
49. Bó GA, Cutaia LE, Souza AH, Baruselli PS. Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche. *IRAC*. 2006;2:1–16.
50. Hinrichs K. Embryo transfer in the mare: A status report. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 1993;33(1–4):227–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843209390117A>
51. Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. *Anim Reprod* [Internet]. 2009;6(1):114–24. Available from: <http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/2446>
52. Salverson RR, DeJarnette JM, Marshall CE, Wallace RA. Synchronization of estrus in virgin beef heifers using melengestrol acetate and PGF<sub>2</sub> $\alpha$ : An efficacy comparison of cloprostenol and dinoprost tromethamine. *Theriogenology* [Internet]. 2002;57(2):853–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01006926>
53. Montaser A., El-Desouky A. Effect of Dinoprost Tromethamine , Cloprostenol and d-Cloprostenol on Progesterone Concentration and Pregnancy in Dairy Cattle. *IOSR J Agric Vet Sci* [Internet]. 2016;9(2):64–7. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/ccd9/27dafcf294907c4372c0527a327478a6d9cc.pdf>
54. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* [Internet]. 1995;44(7):915–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9500279H>
55. Caraviello DZ, Weigel KA, Fricke PM, Wiltbank MC, Florent MJ, Cook NB, et al. Survey of Management Practices on Reproductive Performance of Dairy Cattle on Large US Commercial Farms. *J Dairy Sci* [Internet]. 2006;89(12):4723–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203020672522X>
56. Hamid SA, Kamruzzaman S. Effects of GnRH on Conception Rate at the Time



- of Artificial Insemination in Crossbred Dairy Cows. *Int J Anim Sci Technol* [Internet]. 2018;56(6):19–34. Available from: <http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/paperinfo?journalid=307&doi=10.11648/j.ijast.20170101.14>
57. Dadarwal D, Mapletoft RJ, Adams GP, Pfeifer LFM, Creelman C, Singh J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* [Internet]. 2013;79(5):859–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.003>
  58. Beach E, Glencroos R, Knight P. A new construction of resilient Boolean functions with high nonlinearity. *Soc Reprod Fertil* [Internet]. 2004;109:171–92. Available from: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/127/5/1270621.xml>
  59. Espinal MÁ, Cedeño M. Efecto de los dispositivos intravaginales DIV-B® nuevos o usados y retirados el día 8 ó 9 sobre los porcentajes de sincronización de celo y preñez en vacas cebuinas [Internet]. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano; 2009. Available from: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/423/1/T2875.pdf>
  60. Bó G, Colazo M, Martínez M, Kastelic J, Mapletoft R. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestagenos y diferentes esteres de estradiol. *Inst Reprod Anim córdoba*. 2003;106:71–84.
  61. Bó GA, Tríbulo A, Mapletoft R. Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones en bovinos. *Asociación Peruana de Reproducción Animal* [Internet]. 2011;1(2308–4928):26–33. Available from: <http://spermova.pe/site/index.php/revistas/revista-spermova-nro-1>
  62. Cordova A. Protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones en bovinos. [Internet]. Universidad de Cuenca; 2011. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3050/1/mv167.pdf>
  63. Garzón N, Urrego R, Giraldo C. Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la trasferencia de embriones bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* [Internet]. 2007 Oct;68–77. Available from: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/viewFile/381/1883>
  64. Wijma R, Pérez MM, Masello M, Stangaferro ML, Giordano JO. A resynchronization of ovulation program based on ovarian structures present at nonpregnancy diagnosis reduced time to pregnancy in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018;101(2):1697–707. Available from: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(17\)31122-0/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(17)31122-0/fulltext)
  65. Sá Filho MF, Baldrighi JM, Sales JNS, Crepaldi GA, Carvalho JBP, Bó GA, et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2011;129(3–4):132–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432011002946?via%3Dihub>



66. Bó GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* [Internet]. 2014;81(1):38–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
67. Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araújo R, Bó GA, et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* [Internet]. 2009;72(1):10–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X09000533?via%3Dihub>
68. Vasconcelos JLM, Jardina DTG, Sá Filho OG, Aragon FL, Veras MB. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* [Internet]. 2011;75(6):1153–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10006205?via%3Dihub>
69. Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM, Vasconcelos JLM, Nascimento AB, Souza AH, et al. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows [Internet]. Vol. 76, *Theriogenology*. 2011. p. 1568–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X1100416X?via%3Dihub>
70. Cárdenas EOR, Rueda GA. Efecto de la aplicación de factores liberadores de gonadotropinas (GnRH) y Benzoato de estadiol, sobre el desarrollo y tamaño de los folículos en vacas Brahman. *Rev CITECSA* [Internet]. 2014;4(7):19–28. Available from: <http://www.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa/article/view/51>
71. Restrepo G, Gómez J, Vasquez N. Evaluación de la Superestimulación ovárica y la calidad morfológica de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. *Rev Politécnica* [Internet]. 2011;13(1900–2351):16–21. Available from: <http://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/188/162>
72. Bastidas Y, Hoyos C. Métodos de sincronización del celo en bovinos de leche [Internet]. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD; 2017. Available from: <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/13891/1/1061692707.PDF>
73. Goodhand KL, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2000;63(3–4):145–58. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200000186X?via%3Dihub>
74. De Roover R, Feugang JMN, Bols PEJ, 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. *Reprod Domest Anim*. 2008;43(2):239–45.
75. Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular



- wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* [Internet]. 2004 Jan 15 [cited 2018 Apr 4];61(2–3):329–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662132>
76. Blondin P, Sirard M-A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 1995 May [cited 2018 Apr 4];41(1):54–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619506>
  77. Calier Laboratorios. Pluset®. Vol. 39, Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Madrid: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad; 2008. p. 561–3.
  78. Blondin P, Coenen K, Guilbault L., Sirard M. In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* [Internet]. 1997 Apr;47(5):1061–75. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X97000630>
  79. Denis R. Aspiración folicular in vivo (OPU) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción. *Ciencias y Tecnología Ganadera*. 2008;2(1998–3050):57–70.
  80. Ruiz S, Romero-Aguirregomez 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. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2018 Apr 3];48(6):e81–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12179>
  81. Ruiz S, Astiz S. Producción in vitro de embriones (PIV) en biotecnología de la reproducción bovina. *Asoc Nac Espec Med Bov en España* [Internet]. 2010;9(1):25–32. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/302589551\\_Produccion\\_in\\_vitro\\_PIV\\_de\\_embryones\\_en\\_Biotecnologia\\_de\\_la\\_Reproduccion\\_bovina](https://www.researchgate.net/publication/302589551_Produccion_in_vitro_PIV_de_embryones_en_Biotecnologia_de_la_Reproduccion_bovina)
  82. Solís Corrales A, Guerra R, Sandoya G, De Armas R. Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. *Rev Electron Vet* [Internet]. 2012;13(1695–7504):1–16. Available from: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101012/101210.pdf>
  83. Ferre L, Cattaneo L. Biotecnologías reproductivas: producción in vitro de embriones y semen sexado. *Rev Med Vet* [Internet]. 2013;94(2):28–36. Available from: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/38-biotecnologias.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/38-biotecnologias.pdf)
  84. 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-Australasian J Anim Sci* [Internet]. 2013;26(4):488–500. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093380/>
  85. Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CL, Vander Zwaag DF, Ferré LB. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology* [Internet]. 2003 Jan



- 1 [cited 2018 Apr 4];59(1):125–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499024>
86. Martínez Y. Análisis de la morfología ovocitaria en bovinos previo a la fecundación in vitro [Internet]. Universidad de Oviedo; 2013. Available from: [http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM\\_Yaiza\\_Martinez.pdf](http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM_Yaiza_Martinez.pdf)
87. Samaniego J. Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up ( OPU ) en tiempos diferentes , luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset) en vaquillas Criollas. [Cuenca]: Universidad de Cuenca; 2017.
88. Huanca W, Palomino JM, Cervantes M., Cordero A., Huanca T. Efecto de temperaturas de transporte ( 35 ° C , 4 ° C ) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. APPA - ALPA - Cusco, Perú. 2007;3–5.
89. World Organization for Animal Health. Utilización de animales en la investigación y educación. OIE [Internet]. 2016;1–12. Available from: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_ aw\\_research\\_education.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_ aw_research_education.pdf)
90. Supliguicha D, Pesantez J. Evaluation of follicular wave reset by a mechanical and two pharmacological treatments. ASPRA. 2018;76.
91. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. Theriogenology [Internet]. 1994;41(8):1571–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9490822Z>
92. De Roover R, Genicot G, Leonard S, Bols P, Dessy F. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. Anim Reprod Sci [Internet]. 2005;86(1–2):13–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004001277?via%3Dihub>
93. Palubinskas G, Žilaitis V, Juozaitienė V, Laučienė L, Juodžentis V, Gavelis A, et al. Superovulatory response in relation to the size and side of ovary location in high yielding dairy cows on the first day of treatment protocol. Fac Vet Med Lith Univ Heal Sci Kaunas, Kaunas, Lith [Internet]. 2016;86(1):65–76. Available from: <https://hrcak.srce.hr/153493>
94. Giraldo J, Ordoñez S, Gómez J, Restrepo G. Evaluación de la estimulación ovárica y la calidad de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. J Agric Anim Sci [Internet]. 2017;6(1):20–8. Available from: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1839/1/1459-4878-1-PB.pdf>
95. García J, Romero-Aguirregomezcorta J, Astiz S, Poto A, Ruiz S. Eficiencia de la Ablación folicular y de la administración exógena de GnRH (Dalmarelin®) sobre la producción y calidad ovocitaria en vacas de raza Murciano-Levantina. Congreso Internacionla ANEMBE de Medicina Bovina. 2012;(2):234–6.
96. Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Moreira





- RJC, et al. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve invitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* [Internet]. 2014;82(2):318–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14001927?via%3Dihub>
97. Merton JS, De Roos APW, Mullaart E, De Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. In: *Theriogenology* [Internet]. 2003 [cited 2018 Apr 4]. p. 651–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499010>
98. Cabodevila J, Torqueati S. Gonadotrofina empleada. In: *Biología de la Reproducción*. 2008. p. 79–108.
99. Martínez Y. Análisis de la Morfología ovocitaria en Bovinos previa a fecundación in vitro. Universidad de Oviedo; 2013.
100. Alvarado A, Gamarra G, Gallegos A, Samillán V. Tasa de recuperación de ovocitos en vacas holstein en descarte. *An Científicos* [Internet]. 2016;77(1):63–8. Available from: [http://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/acu/article/view/545/pdf\\_11](http://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/acu/article/view/545/pdf_11)
101. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM, Taverne MAM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* [Internet]. 1988 Oct;30(4):751–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X8890310X?via%3Dihub>

## 7. ANEXOS

### *Anexo 1: Materiales cotidianos de campo*



Materiales básicos. **Fuente:** Autores.



Materiales para OPU. **Fuente:** Autores.

**Anexo 2: Materiales y Hormonas para sincronización**



Benzoato de estradiol (Grafoléon NF). **Fuente:** Autores.



Implante de progesterona (DIB® 0.5g). **Fuente:** Autores.



Implantador DIB® 0.5g. **Fuente:** Autores.



PGF2α (Lutaprost® 250). **Fuente:** Autores.



Parches detectores de celo. **Fuente:** Autores.

### Anexo 3: Materiales empleados en los Tratamientos

#### Método farmacológico



GnRH (Fertagyl®). **Fuente:** Autores.

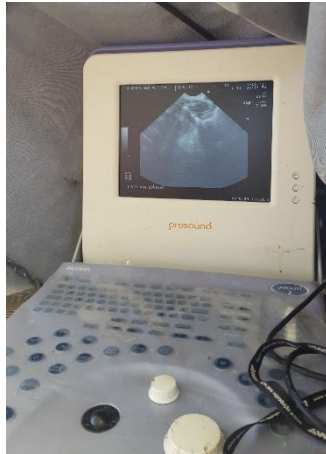


BE (Grafolón NF). **Fuente:** Autores.

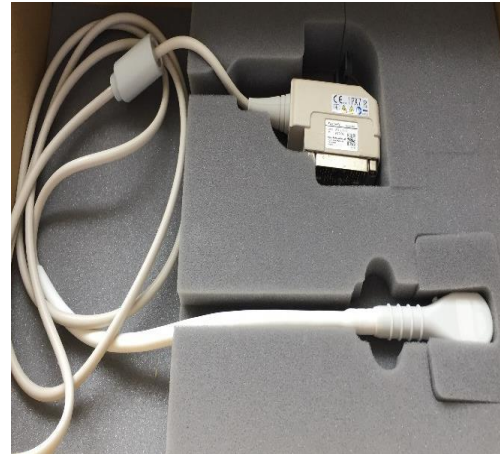
#### Método mecánico: ablación folicular



Lidocaína (ROXICAINA® 2%), Xilacina (Dormi-XYL® 2). **Fuente:** Autores.



Equipo de ultrasonido ALOKA® ProSound2 Vet.  
**Fuente:** Autores.



Transductor sectorial. **Fuente:** Autores.



Porta sonda. **Fuente:** Autores.



Bomba de aspiración. **Fuente:** Autores.

#### Anexo 4: Material usado para estimulación ovárica



FSH-LH (Pluset®). Fuente: Autores.

#### PRESENTACIÓN

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

#### APLICACIÓN

Inyectable

#### DESCRIPCIÓN

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

#### COMPOSICIÓN

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

## Anexo 5: Materiales y secuencia para Ovum pick-up

### Sedación



Manga de contención. **Fuente:** Autores.



Xilacina (Dormi-XYL® 2). **Fuente:** Autores.

### Bloqueo epidural



Corte zona lumbosacra. **Fuente:** Autores.



Lidocaína (ROXICAINA® 2%). **Fuente:** Autores.

### **Asepsia**



Vaciado de contenido rectal. **Fuente:** Autores.



Desinfección. **Fuente:** Autores.

### **Aspiración folicular**



Equipo de OPU **Fuente:** Autores.



Visualización de folículos. **Fuente:** Autores.



PBS. **Fuente:** Autores.





**Anexo 6: Plantilla de registro del número de folículos visualizados**

FECHA:	<input type="text"/>	HORA:	<input type="text"/>
DOCTOR A CARGO:	<input type="text"/>	TRATAMIENTO:	<input type="text"/>
		REPETICIÓN:	<input type="text"/>

N°	IDENTIFICACIÓN DONANTES	N° DE FOLICULOS >5mm ASPIRADOS			OBSERVACIONES
	ARETE	O. DERECHO	O. IZQUIERDO	TOTAL	
1					
2					
3					
			<b>TOTAL</b>		

**Anexo 7: Materiales a nivel de laboratorio**



Filtro EMCON. **Fuente:** Autores.



Cajas Petri. **Fuente:** Autores.



Estereomicroscopio. **Fuente:** Autores.



Pipetas. **Fuente:** Autores.



Platina de calefacción. **Fuente:** Autores.



**Anexo 8: Plantilla de calificación de COC's**

FECHA:

HORA:

TECNICO A CARGO:

REPETICIÓN:

N°	TRATAMIENTO	N° DE FOLICULOS >5mm ASPIRADOS	CLASIFICACIÓN COC's						OBSERVACIONES
			Aptos		TOTAL	No Aptos		TOTAL	
			A	B		C	D		
1									
2									
3									
				<b>TOTAL</b>			<b>TOTAL</b>		

**Anexo 9: Operacionalización de las variables**

Problema	Hipótesis	Variable	Dimensiones	Indicador	Escala	Estadística
Necesidad de estimular los ovarios con protocolos alternativos	El número y calidad de ovocitos obtenidos por <i>Ovum</i> pick-up en vaquillas Holstein mestizas estimuladas con FSH-LH, difieren al utilizar la sincronización previa de la onda folicular con Benzoato de estradiol (BE), GnRH y Ablación folicular	<b>Independiente cuantitativa:</b> <b>Tratamientos de estimulación ovárica:</b> 1.-GnRH+(FSH-LH)+OPU 2.-Estradiol+(FSH-LH)+OPU 3.-Benzoato de estradiol+(FSH-LH)+OPU	Tres tratamientos de estimulación ovárica en el cual diferente el mecanismo (farmacológico y mecánico) que reinicia la onda folicular	Protocolo	Dosis/T	Anova
		<b>Dependientes cuantitativas:</b> 1.-Foliculos disponibles en el momento de la OPU	Número de foliculos entre 4-8mm disponibles para la OPU	Número de foliculos	Numérica	Anova
		2.-COC's recuperados por OPU	Número de COC's recuperados por la OPU	Número de COC's	Numérica	Anova
		3.-Calidad de COC's	Cantidad de COC's clasificados como aptos y no aptos para la PIV	1.-Aptos 2.-No aptos	1. A y B 2. C y D	Anova