

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Concentración de la hormona folículoestimulante y respuesta a un protocolo de superovulación administrado por vía epidural en vacas Holstein

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

Autor:

Paul Danilo Delgado Tello

Ashley Nicole Vásquez Prado

Director:

Luis Eduardo Ayala Guanga

ORCID:  0000-0001-6543-7594

Cuenca, Ecuador

2024-01-12

Resumen

La investigación se llevó a cabo en la Granja Nero de la Universidad de Cuenca, el objetivo fue determinar la concentración plasmática de la hormona Folículo-estimulante (FSH) y la respuesta ovárica al aplicar 200 mg de FSH, en dosis única vía epidural, en vacas Holstein mestizas. Se compararon dos vías de administración de la FSH en un protocolo de superovulación (SOV): intramuscular (T1) y epidural (T2). Se valoró la concentración de la FSH, respuesta superovulatoria, porcentaje de ovulación, cantidad y calidad de estructuras recolectadas en cada tratamiento. La concentración de FSH se mantuvo alta hasta la hora 50, después, la hormona disminuyó hasta llegar a niveles basales en ambos tratamientos. El número de folículos observados después del tratamiento de SOV fue similar en T1 ($15,5 \pm 4,29$) y T2 ($15,3 \pm 1,89$). No se observó diferencia significativa en el diámetro de los folículos en T1 ($11,9 \pm 0,49$ mm) y T2 ($10,8 \pm 1,49$ mm) $p > 0,05$. La cantidad de cuerpos lúteos en T1 ($2,8 \pm 1,03$) y T2 ($7,5 \pm 3,7$), así como su tamaño (T1= $16,80 \pm 0,68$ mm; T2= $18,1 \pm 0,99$ mm) fueron similares ($p > 0,05$). Asimismo, se observó una gran cantidad de folículos que no ovularon (T1= $12,8 \pm 4,33$; T2 = $7,50 \pm 2,59$); y tampoco se encontró diferencia estadística entre el número de estructuras (T1= $1,8 \pm 0,9$; T2= $4,8 \pm 3,0$) y embriones transferibles colectados (T1= $0,5 \pm 0,3$; T2= $3,8 \pm 2,6$) al final del protocolo. En conclusión, la FSH administrada por vía epidural mantuvo niveles similares durante las primeras 50 h a los observados al aplicar la FSH vía intramuscular en un protocolo convencional; sin embargo, a las 52 h, la concentración de FSH bajo a niveles basales en T1, los cuales se mantuvieron hasta el final del protocolo.

Palabras clave: superovulación, epidural, FSH, cuerpo lúteo, embrión



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The research was carried out at the Nero Farm of the University of Cuenca, the objective was to determine the plasma concentration of Follicle Stimulating Hormone (FSH) and the ovarian response when applying 200 mg of FSH, in a single dose epidurally, in cows. Holstein crossbreeds. Two routes of FSH administration were compared in a superovulation (SOV) protocol: intramuscular (T1) and epidural (T2). The FSH concentration, superovulatory response, ovulation percentage, quantity and quality of structures collected in each treatment were assessed. The FSH concentration remained high until hour 50, then the hormone decreased until reaching basal levels in both treatments. The number of follicles observed after SOV treatment was similar at T1 (15.5 ± 4.29) and T2 (15.3 ± 1.89). No significant difference will be observed in the diameter of the follicles in T1 (11.9 ± 0.49 mm) and T2 (10.8 ± 1.49 mm) $p > 0.05$. The number of corpora lutea in T1 (2.8 ± 1.03) and T2 (7.5 ± 3.7), as well as their size (T1= 16.80 ± 0.68 mm; T2= 18.1 ± 0.99 mm) were similar ($p > 0.05$). Likewise, a large number of follicles that did not ovulate were observed (T1= 12.8 ± 4.33 ; T2 = 7.50 ± 2.59); and no statistical difference was found between the number of structures (T1= 1.8 ± 0.9 ; T2= 4.8 ± 3.0) and transferable embryos collected (T1= 0.5 ± 0.3 ; T2= 3.8 ± 2.6) at the end of the protocol. In conclusion, FSH administered epidurally maintained similar levels during the first 50 h to those observed when FSH was applied intramuscularly in a conventional protocol; However, at 52 h, the FSH concentration dropped to basal levels in T1, which were maintained until the end of the protocol.

Keywords: superovulation, epidural, fsh, corpus luteum, embryo



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen	2
Abstract	3
Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
Agradecimientos	8
Dedicatoria	9
Introducción	10
Objetivos	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
Revisión de literatura	13
Multiovulación y transferencia de embriones	13
Superovulación.....	13
Variabilidad de la respuesta superovulatoria	13
Hormonas utilizadas en el protocolo SOV	14
Hormona folículoestimulante (FSH)	14
Vías de administración.....	15
Frecuencia de la aplicación de FSH.....	15
Farmacocinética y farmacodinamia de la FSH vía epidural.....	16
Niveles plasmáticos de la FSH.....	17
Materiales y Métodos	18
Materiales.....	18
Materiales biológicos	18
Materiales químicos	18
Materiales físicos	18
Metodología	19
Área de estudio.....	19
Ubicación geográfica	19
Animales de granja	19
Diseño experimental	20
Protocolo de SOV, mediante la administración de FSH vía intramuscular.....	20
Protocolo de SOV, mediante administración de FSH vía epidural.....	21
Valoración de la concentración de FSH en plasma	22
Valoración de la respuesta superovulatoria y de la ovulación	22

Preparación del animal previo al proceso de recolección de embriones	23
Resultados y discusión	24
Peso, condición corporal (CC) y recuento de folículos antrales de los animales.....	24
Concentración de la hormona folículoestimulante (FSH) post-aplicación de una dosis única de 200 mg de FSH vía epidural.....	24
Recuento de folículos antrales valorados en el día 0 y 9 del protocolo de superovulación	26
Diámetro de folículos visualizados en el día 9 del protocolo de SOV.....	28
Recuento y diámetro de cuerpos lúteos (CL) en el día 16 del protocolo de SOV	28
Recuento y diámetro de folículos que no ovularon en el día 16 del protocolo SOV	30
Recuento de estructuras y embriones colectados en el día 16 del protocolo de SOV.....	31
Conclusiones	33
Referencias	34
Anexos.....	44

Índice de figuras

- Figura 1.** Mapa Satelital, ubicación geográfica Granja Experimental “Nero” de la facultad de ciencias agropecuarias de la Universidad de Cuenca. **Fuente:** Directorio Cartografico de Google Maps, 2021..... 19
- Figura 2.** Esquema del protocolo de superovulación, con la administración de FSH vía intramuscular. BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. CIDR=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH=Hormona folículoestimulante. PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Gonadorelina. IA=inseminación artificial. Lavado=colecta de embriones..... 21
- Figura 3.**Esquema del protocolo de superovulación por via epidural. BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. CIDR=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH=Hormona folículoestimulante. PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Gonadorelina. IA= inseminación artificial. Lavado=colecta de embriones. 21
- Figura 4.** Concentración media de FSH en T1 (intramuscular) y T2 (epidural) valorada a partir del día 4 a las 0; 2; 4; 12; 24; 26; 28; 36; 48; 50; 52; 60; 72; 74; 76; 84 horas..... 25
- Figura 5.** Media y error estándar del recuento de folículos antrales (RFA) en el día 0 (Panel 1). En el Panel 2 se describe la respuesta al protocolo de superovulación (día 9) y el porcentaje de superovulación observado (Panel 3). Prueba T de student..... 27
- Figura 6.** Media y error estándar del tamaño de los folículos que respondieron a la SOV, valorado el día 9 del protocolo. Prueba de T de Student..... 28
- Figura 7.** Media y error estándar del número de cuerpos lúteos observados en los dos tratamientos el día 16 del protocolo (Panel 1). Tamaño medio de los cuerpos lúteos contabilizados el día 16 (Panel 2). Prueba de T de Student..... 29
- Figura 8.** Media y error estándar del número (Panel 1) y tamaño (Panel 2) de los folículos que no ovularon en los dos tratamientos en el día 16 del protocolo. Prueba de T de Student.... 31
- Figura 9.** Media y error estándar del total de estructuras (Panel 1) y de embriones (Panel 2) colectados el día 16 del protocolo en ambos tratamientos. Prueba de T de Student..... 32

Índice de tablas

Tabla 1. Planificación del horario para la toma de muestras sanguíneas.....	22
Tabla 2. Características generales de las donadoras previo al inicio de los tratamientos de superovulación.....	24

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi madre, quien me apoyo en todo momento dándome aliento para no dejarme vencer y poder lograr mis objetivos.

De manera especial, agradezco también al Dr. Luis Ayala, por brindarnos su paciencia y conocimientos que nos guiaron a seguir adelante en todo el proceso de este proyecto de titulación.

Finalmente, quiero agradecer a todos los maestros y amigos quienes me apoyaron y estuvieron en este trayecto de manera directa o indirecta.

¡Muchas gracias a todos!

Paul Delgado

Agradezco a mi padre por ser el motivo y la razón de todos mis logros, por su trabajo y sacrificio diario para formarme como persona de bien; a mis hermanos Brittney y Josué quienes me han brindado su ayuda incondicionalmente y me ha impulsado para lograr mis objetivos.

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

A mis amigos y a todos los docentes que de una u otra forma me brindaron su apoyo y se involucraron en este trabajo impartiendo sus conocimientos y experiencias de manera desinteresada.

Ashley Vásquez

Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo a mi madre Laura, quien ha sido el pilar fundamental de mi vida, quien me ha forjado como persona, y quien ha estado conmigo brindándome su apoyo incondicional durante todo el proceso de mi formación profesional.

A mis abuelos que me han ayudado siempre, a toda mi familia y de forma muy especial, dedico este proyecto a la memoria de mi primo Erick y de mis bisabuelos Deifilio y Rosa.

Paul Delgado

Dedico este trabajo a mi padre Nelson que siempre me apoyó en todas mis decisiones y me supo dar las mejores palabras de aliento para no dejarme vencer.

A mis hermanos Brittney y Josué quienes han estado para mí cuando los necesitaba, a mi familia, amigos y todas las personas que me apoyaron en las diversas facetas de mi vida.

Ashley Vásquez

Introducción

En los protocolos de superovulación (SOV) comúnmente se utiliza la hormona Folículo-estimulante (FSH), que impulsa el crecimiento y desarrollo de varios folículos antrales pequeños hasta el estadio de dominancia (Bautista et al., 2019), proporcionando un mayor número de folículos que después de la ovulación proveen ovocitos listos para ser fecundados y luego colectados (Becaluba, 2007).

Sin embargo, la vida biológica media de la FSH es de 5 horas, condicionante que crea la necesidad de administrar mañana y tarde durante 4 días consecutivos (8 aplicaciones), con diferencia de 12 horas entre dosis (Bó & Mapletoft, 2014). Esta manipulación de la donadora puede provocar estrés y esto a su vez repercutir sobre la respuesta superovulatoria; además, aplicaciones consecutivas pueden llevar a errores en la dosificación del producto (Kimura, 2016).

Varios estudios han buscado reducir el número de aplicaciones de FSH mediante la administración intramuscular o subcutánea de esta gonadotropina disuelta en agentes de liberación lenta, como la polivinilpirrolidona (Ratsiri et al., 2021) e hidróxido de aluminio en gel (AH-gel) en bovinos (Kimura, 2016). Estos diluyentes mezclados con la FSH producen una solución viscosa difícil de preparar y homogenizar, y además, incrementan el costo final del protocolo (Kimura, 2016).

Se ha reportado que la aplicación de una dosis única de FSH por vía epidural (400 mg) provoca estimulación ovárica en bovinos, generando resultados alentadores en cuanto a número de embriones colectados, similares a los que se obtienen al aplicar un protocolo convencional (Sakaguchi et al., 2018). La liberación lenta de la FSH en la circulación periférica se consigue gracias a la alta cantidad de grasa que contiene el conducto epidural del ganado de carne; sin embargo, los resultados podrían variar en ganado de aptitud lechera por su condición corporal (Lee et al., 2001).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado resultados que valoran la respuesta superovulatoria mediante la aplicación de una dosis única de FSH (200 mg) por vía epidural en vacas Holstein mestizas y observó una respuesta SOV similar ($P > 0,05$) entre donadoras que recibieron el protocolo convencional (8 dosis de FSH=17,6 folículos) y el alternativo (FSH dosis única vía epidural=13,9 folículos), con un diámetro de folículos valorados en el día 9 del protocolo similar (10,5 mm y 9,9 mm respectivamente) en ambos tratamientos; sin embargo, el número de folículos que llegaron a ovular contabilizado a través del número de cuerpos lúteos fue menor (7,8 CL) en el protocolo alternativo (vía epidural), comparado con los 14,4 CL observados en el protocolo convencional, además el diámetro de

CL fue menor en el protocolo alternativo (11,1 mm) vs. el convencional (14,8 mm); finalmente, luego de la colecta de embriones se obtuvieron 3,4 embriones viables (vía epidural) vs. 8,7 en el protocolo convencional (Araujo & Cordero, 2021).

Estos resultados nos lleva a pensar que la aplicación de 200 mg de FSH vía epidural en dosis única , permitiría mantener niveles altos de la hormona por un tiempo menor a 72 horas en promedio, lo cual es requerido para que los folículos puedan crecer y adquirir capacidad ovulatoria (Kanitz et al., 2002), lo que conlleva a una disminución de la respuesta superovulatoria y reducción en el porcentaje de recuperación y calidad de embriones, tal como ha descrito Chumchai et al. (2021). Por lo tanto, es necesario realizar estudios adicionales sobre las concentraciones de FSH post- aplicación vía epidural y la respuesta superovulatoria a este protocolo.

Objetivos

Objetivo General

Cuantificar la concentración plasmática de la hormona Folículo-estimulante (FSH) y la respuesta ovárica al aplicar 200 mg de FSH vía epidural en vacas Holstein mestizas.

Objetivos Específicos

- Medir la concentración de la hormona Folículo-estimulante post-aplicación de una dosis única de 200 mg de FSH vía epidural.
- Valorar la respuesta ovárica al proceso de superovulación con una dosis única de FSH vía epidural en vacas Holstein mestizas.

Revisión de literatura

Multiovulación y transferencia de embriones

El concepto de multiovulación y transferencia de embriones (MOET, por sus siglas en inglés) fue introducido en la Universidad de Guelph en 1987 por Smith citado por Lonergan & Boland, (2011) haciendo referencia a una herramienta biotecnológica importante para el mejoramiento genético de los animales (Rodrigues et al., 2017). Se trata de un proceso que somete a la donante a un tratamiento hormonal de estimulación ovárica para posteriormente ser inseminada con el fin de colectar el mayor número de embriones transferibles a múltiples receptoras que genéticamente no están relacionadas (Hasler, 2004). Esta técnica se puede aplicar en varias especies como vacas, ovejas, búfalas, cerdas y cabras (Faizah et al., 2018) con el fin de incrementar la mejora genética hasta un 65% en la progenie de estos animales (Lonergan & Boland, 2011).

Esta biotecnología necesita de la aplicación de protocolos de superovulación (SOV, por sus siglas en inglés) en las vacas donadoras, para lo cual se han utilizado diferentes esquemas de aplicación de fármacos para lograrlo. No obstante, a pesar de los intentos de mejorar la técnica los resultados no han mostrado variaciones importantes (Maldonado & Bolívar, 2008).

Superovulación

La superovulación de la hembra donante es indispensable para todos los procedimientos involucrados en la transferencia de embriones (Mogollon & Burla, 2013). El procedimiento implica la sincronización del estro y la ovulación mediante la aplicación exógena de un tratamiento hormonal y la estimulación ovárica a través de la aplicación exógena de la hormona FSH con el fin de desarrollar y madurar varios folículos simultáneamente, posibilitando la producción y recolección de embriones luego de la inseminación (Kolling et al., 2021).

El tratamiento se considera efectivo cuando se logran más de dos ovulaciones por donante, es decir, en lugar de obtener un servicio anual con gestación por animal se obtienen 10 a 20 servicios eliminando el tiempo de gestación de la hembra donante (Motta et al., 2011). Aproximadamente el 85% de la donadoras fértiles responden positivamente al protocolo SOV obteniendo seis embriones transferibles por hembra en promedio (Garzón et al., 2007).

Variabilidad de la respuesta superovulatoria

En un protocolo SOV exitoso generalmente se obtiene una media de seis embriones utilizables (Garzón et al., 2007), sin embargo, existe la probabilidad de que entre 20-30% de hembras superovuladas no respondan al tratamiento o no se recuperen embriones o se produzcan muy pocos embriones de buena calidad (Becaluba, 2007), por este motivo es muy

difícil predecir la respuesta de un protocolo de superovulación (Gabriel Bó & Mapletoft, 2014; Seidel & Seidel, 1991).

A lo largo del tiempo se ha tratado de explicar mediante numerosos estudios la gran variación individual que existe en la respuesta ovárica a los tratamientos SOV con la finalidad de reducirla, sin embargo, el éxito de la biotecnología está condicionada por factores intrínsecos o extrínsecos no controlables que disminuyen la respuesta superovulatoria, pudiendo llegar incluso a la ausencia total de la misma (Bó et al., 2011).

Hormonas utilizadas en el protocolo SOV

Con el fin de promover la superovulación de la hembra donante se puede administrar la gonadotropina coriónica equina (eCG) asociada a un suero anti-eCG o de forma aislada (Edelman et al., 2003) o la hormona foliculoestimulante (FSH) purificada de la glándula pituitaria de porcinos, equinos u ovinos (Machado et al., 2013).

La eCG consigue una respuesta superovulatoria cuando se aplicaba entre los días 8-12 del ciclo estral, sin embargo, tiene una vida media de 40 horas y persiste en la circulación hasta por 10 días (Murphy & Martinuk, 1991), provocando la estimulación prolongada del crecimiento folicular (Mogollon & Burla, 2013) acompañados de niveles de estrógenos altos que afectan directamente a la calidad embrionaria y a la tasa de fertilización (Takedomi et al., 1994). Asimismo, se ha comprobado que para obtener resultados similares en tratamientos posteriores, existe la necesidad de aumentar la dosis de administración debido a que dicha hormona promueve la aparición de anticuerpos anti-eCG (Kimura et al., 2007).

Hormona folículoestimulante (FSH)

La hormona folículoestimulante juega un rol muy importante en los procesos reproductivos de varios vertebrados debido a que impulsa el crecimiento y desarrollo de varios folículos secundarios hasta el estadio de dominancia (Madrid et al., 2016). Esta hormona es sintetizada en la adenohipófisis y actúa en las células de la granulosa del ovario estimulando la foliculogénesis y la esteroidogénesis (Bautista et al., 2019). Comúnmente se utiliza la FSH-p (extracto de pituitaria porcina) en los protocolos SOV (Ponce, 2015), pero, debido a que posee una vida media corta (5 horas o menos) se requiere varias aplicaciones vía intramuscular para conseguir el efecto deseado (Machado et al., 2013). Para que se desarrollen varios folículos y pueda ocurrir la superovulación que permita colectar una mayor cantidad de embriones, se necesitan entre 6 a 8 aplicaciones de FSH con intervalos de 12 horas durante 3 a 4 días (Fonseca et al., 2001). Para obtener los mejores resultados posibles, las hormonas deben ser aplicadas en tiempos y cantidades previamente establecidas según el protocolo y animales a utilizar (Vilcatoma, 2018).

La FSH-p se obtiene a partir de un proceso que incluye la filtración del extracto de pituitaria porcina; precipitación de proteínas; y separación cromatográfica por intercambio iónico, adsorción y exclusión de la glucoproteína, aunque no se ha determinado la pureza de FSH-p, se ha demostrado que el producto final posee una alta potencia biológica (Deguettes et al., 2020).

Estudios demostraron que la FSH pura no es adecuada para provocar superovulación debido a que afectará negativamente a la respuesta superovulatoria (Jiménez, 2009). En los preparados comerciales debe existir la presencia de LH con el fin de lograr mejores resultados en el protocolo, recomendándose un nivel máximo de 15-20% de LH debido a que concentraciones mayores provoca efectos no deseados en la producción y calidad embrionaria (Mogollon & Burla, 2013).

Vías de administración

En el tratamiento de SOV la principal vía de administración de la FSH es la intramuscular (IM), aunque también se obtuvieron resultados deseables con la vía subcutánea (SC) (Mapletoft et al., 2002); adicionalmente se ha utilizado la vía intravenosa con infusiones continuas del fármaco (Cabodevila & Torquati, 2008). Varios han sido los estudios sobre vías de administración de FSH, sin embargo, la inyección IM en dosis decrecientes durante 3 a 4 días genera mejores resultados, excepto cuando el compuesto es aplicado en la parte posterior de la escapula en un sola dosis vía SC, debido a que se generan resultados similares a la inyección IM (Castro & Rodríguez, 2014).

Actualmente se estudia la epidural como vía de administración de FSH debido a que provoca resultados similares al protocolo convencional (Sakaguchi et al., 2018). Se aconseja utilizar esta vía con una única dosis total para reducir el estrés ocasionado en los animales por las múltiples punciones y movilizaciones que tienen que experimentar con el protocolo convencional (Cabodevila & Torquati, 2008).

Frecuencia de la aplicación de FSH

En los protocolos convencionales se utiliza una dosis total (400 mg) de FSH, que debe ser administrada de manera decreciente en dos dosis diarias (am/pm) durante tres a cuatro días (Arriaga, 2010) dependiendo del animal, la raza, y la variabilidad del animal (Jiménez, 2009). El ganado *Bos taurus* es menos sensible a la acción de FSH en comparación al ganado *Bos indicus* (Becaluba, 2007). En condiciones de difícil acceso y manejo de los animales, la administración de una sola dosis de FSH al día durante 3 a 4 días puede ser considerada debido a que varios estudios demostraron que se obtienen resultados similares en comparación a la aplicación dos veces por día (Jiménez, 2009). En cuanto a la vía

subcutánea, la administración de una sola dosis de FSH produce resultados deseables en el protocolo SOV (Hasler et al., 1983). La administración de FSH vía epidural en dosis única induce un desarrollo folicular semejante al protocolo convencional de dos dosis diarias vía IM (Sakaguchi et al., 2018).

Farmacocinética y farmacodinamia de la FSH vía epidural

El objetivo principal de la administración de fármacos vía epidural es alcanzar un efecto más eficaz que cuando se administra a través de la vía sistémica (Castiñeiras, 2007).

La absorción y distribución del fármaco en la vía epidural depende directamente de la cantidad de grasa epidural (Apaza, 2017; Mugabure et al., 2005). Los compuestos administrados en el espacio epidural son expuestos a un área vascular relativamente grande que permite una rápida absorción y distribución del fármaco a través de la sangre (Lee et al., 2001; Rioja et al., 2013). Los fármacos aplicados en la vía epidural pueden tener varios destinos: la grasa epidural, los ligamentos, el espacio muscular paraespinal y las meninges espinales, y la mayor parte de estos destinos disminuyen la probabilidad de que el medicamento alcance la medula espinal (Siafaka, 2012).

La solubilidad de los medicamentos depende de sus características fisicoquímicas (hidrosolubles o liposolubles), esto determina su farmacocinética y distribución en el torrente sanguíneo. Para llegar a la circulación periférica el fármaco tienen que atravesar las meninges, los fármacos liposolubles poseen un inicio de acción más rápido que los hidrosolubles debido a que alcanzan la medula espinal de forma rápida gracias a la facilidad para atravesar las membranas (Casati, 2000).

La FSH es una glicoproteína que posee dos subunidades polipeptídicas llamadas alfa (α) y beta (β) (Narváz & Tamay, 2013). El fármaco debe ser primeramente absorbido para llegar a su lugar de acción, para esto debe atravesar varias membranas que le permiten llegar hacia la sangre, posteriormente al líquido intersticial y finalmente a las células diana en donde realizara su función. Mucho tienen que ver las proteínas de fijación existentes en el plasma sanguíneo ya que de estas depende el transporte del fármaco desde la sangre hacia los tejidos (Armijo, 2003); asimismo se debe tener en cuenta los sistemas enzimáticos de las meninges que son capaces de metabolizar las drogas (Siafaka, 2012).

A través de la vía epidural las concentraciones de FSH en el plasma sanguíneo se encuentran aproximadamente tres horas después de su aplicación y su pico de concentración máxima es de $5,7 \pm 2,5$ horas después de su administración (Sakaguchi et al., 2018). Posteriormente, la FSH se acopla a las células de la granulosa ovárica a través de receptores denominados

polipéptidos de tipo G, activando la adenilatociclasa y la proteína cinasa dependiente de AMPc (Narváez & Tamay, 2013).

Niveles plasmáticos de la FSH

Fisiológicamente, la aparición de una nueva onda folicular está directamente relacionada con el aumento en los niveles de FSH, que puede incrementar entre 1,5 a 2 veces la concentración basal (Franco & Uribe, 2012). Durante el periodo interovulatorio del ganado *Bos Indicus* las concentraciones basales de FSH oscilan entre 0,2 - 0,8 ng/ml (Castilho et al., 2007) y en el ganado *Bos taurus* se mantiene entre 0,2 – 3 ng/ml (Lane et al., 2009). La concentración al momento del pico de FSH puede llegar hasta 6 ng/ml (Ginther et al., 2001). Dicho pico ocurre entre 12 y 24 horas antes de la aparición de la onda folicular (Butler et al., 2008), debido a que los bovinos presentan múltiples ondas foliculares. Se ha observado que el pico de FSH son más altos en la onda ovulatoria en comparación con la onda anovulatoria (Forde et al., 2011).

Existen muy pocos estudios sobre la concentración plasmática de FSH cuando es aplicada de manera exógena. Recientemente se comparó la curva de la hormona en un protocolo SOV convencional y un protocolo alternativo con una sola dosis de fármaco vía epidural (Chumchai et al., 2021). Los resultados demostraron que en el protocolo convencional la concentración plasmática de FSH aumentó después de 2 horas de la administración y se mantuvo relativamente constante hasta por 10 horas y conservándose en la circulación hasta 72 horas. A las 79 horas posteriores a la primera inyección los niveles de la hormona disminuyeron a un nivel más bajo que a la hora 0 de la administración (Chumchai et al., 2021). Por el contrario, la concentración plasmática de FSH en el grupo alternativo aumentó drásticamente en 2 horas y alcanzo un pico durante aproximadamente 2 horas, disminuyendo a partir de entonces a un nivel menor al registrado a hora 0, aproximadamente 10 horas después de la aplicación. En conclusión, la concentración de FSH plasmática luego de la aplicación epidural fue menor en todo momento que la alcanzada por el grupo control (Chumchai et al., 2021).

Materiales y Métodos

Materiales

Materiales biológicos

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

Materiales químicos

- Kit de Elisa FSH (Bovine follicle-stimulating hormone Elisa Kit. MyBiosource inc. California. USA)
- Dispositivo intravaginal de progesterona (DIP; CIDR®; 1,9 g de progesterona; Zoetis, Quito, Ecuador)
- Benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®; Zoetis, Quito, Ecuador 1 mg/ml)
- Progesterona inyectable (Progesterona®; ERMA, Quito, Ecuador 25 mg/ml)
- Prostaglandina (PG; dinoprost trometamina; Lutalyse®, Zoetis, Quito, Ecuador 25 mg)
- Gonadorelina (GnRH®, MSD, Nueva York, USA 0,1 mg)
- Hormona folículo estimulante FSH (Folltropin-V®, Vetoquinol, Québec, Canada 400 mg)
- Xilacina 2% (Xilacina²⁰, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina)
- Lidocaína 2% (Lidocaine™, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina)
- Yodo povidona
- Alcohol 70%
- Medio de lavado (ViGRO™, Vetoquinol, Québec, Canada)

Materiales físicos

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

- Plantillas de campo

Metodología

Área de estudio



Figura 1. Mapa Satelital, ubicación geográfica Granja Experimental “Nero” de la facultad de ciencias agropecuarias de la Universidad de Cuenca. **Fuente:** Directorio Cartográfico de Google Maps, 2021.

Ubicación geográfica

El estudio se realizó en la granja de Nero de la Universidad de Cuenca, ubicada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, Parroquia Baños, sector Nero ($2^{\circ}57'32.4''S$ $79^{\circ}06'13.2''W$), con una altitud de 3.100 m s.n.m., una temperatura de 7 - 8 °C y una precipitación pluvial que varía de 500-1.000 milímetros (mm) anuales.

Animales de granja

Se seleccionaron 8 vacas de raza Holstein mestizas, cíclicas, con una condición corporal entre 2,5 a 3 en una escalada de 1-5 de acuerdo a lo determinado por Hoedemaker et al. (2009) en la que 1 es emaciado y 5 es obeso, sin problemas reproductivos, cíclicas, con más de 60 días post parto y que pasaron la prueba del enhebrado (paso del dilatador a través del cérvix).

Diseño experimental

La investigación realizada fue de tipo experimental, teniendo como variable independiente la vía de aplicación de la FSH: intramuscular (T1) vs. epidural (T2). Las variables dependientes evaluadas fueron: concentraciones de FSH durante el día 4, 5, 6 y 7 del protocolo de SOV, respuesta a la superovulación valorada el día 9, porcentaje de ovulación y cantidad y calidad de embriones colectados el día 16 del protocolo.

Las 8 vacas seleccionadas se repartieron al azar en los dos tratamientos descritos a continuación:

- **T1** = vía de administración de la FSH intramuscular (n=4)
- **T2** = vía de administración de la FSH epidural (n=4)

Protocolo de SOV, mediante la administración de FSH vía intramuscular

Las cuatro donadoras de T1 recibieron un protocolo de SOV en el cual la FSH fue administrada vía epidural. Brevemente, el protocolo empezó a las 06h00 am del día 0, con la colocación de un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR de 1,9 g de progesterona) más la aplicación IM de 2 mg benzoato de estradiol (Gonadiol) y 50 mg de progesterona inyectable (Progesterona). A partir del cuarto día los animales recibieron dos veces al día (06h00 y 18h00) dosis decrecientes de FSH vía intramuscular: día 4 (06h00 = 60 mg; 18h00 = 60 mg), día 5 (06h00 = 40 mg; 18h00 = 40 mg), día 6 (06h00 = 30 mg; 18h00 = 30 mg). Adicionalmente, el día 6 en la mañana (06h00) y en la tarde (18h00) se aplicaron 25 mg de prostaglandina (Lutalyse). El día 7 se inyectaron a las 06h00 = 20 mg de FSH al igual que a las 18h00; además, el día 7 en la mañana se retiró el dispositivo intravaginal de progesterona. Al día siguiente (día 8), a las 06h00 se colocó un parche detector de celo y en la tarde se aplicó 0,25 mg de gonadorelina (Fertagyl). El día 9 en la mañana se realizó la primera inseminación y en la tarde la segunda IA, y la colecta de los embriones fue ejecutada en el día 16 del protocolo (**Figura 2**).

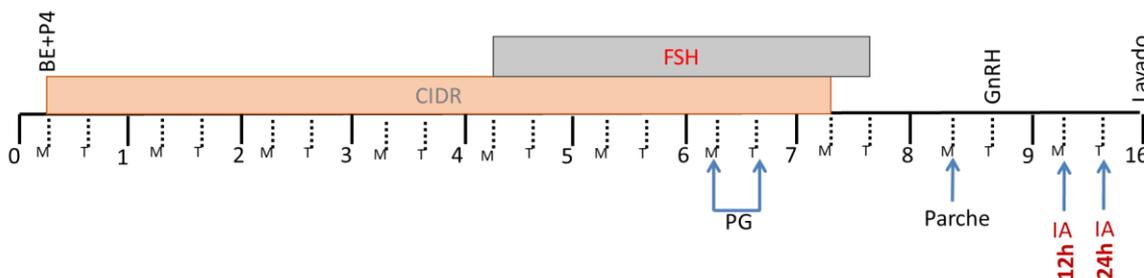


Figura 2. Esquema del protocolo de superovulación, con la administración de FSH vía intramuscular. BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. CIDR=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH=Hormona folículoestimulante. PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Gonadorelina. IA= inseminación artificial. Lavado=colecta de embriones.

Protocolo de SOV, mediante administración de FSH vía epidural

En T2 los animales recibieron el siguiente protocolo: a las 06h00 en el día 0 se colocó un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR de 1,9 g de progesterona) más la aplicación IM de 2 mg benzoato de estradiol (Gonadiol) y 50 mg de progesterona inyectable (Progesterona). En la mañana (06h00) del día 4 los animales recibieron una sola dosis de FSH (200 mg) diluidos en 5 ml de solución salina por vía epidural, entre el espacio de la última vértebra sacra y la primera coccígea. El día 6 en la mañana (06h00) y en la tarde (18h00) se aplicaron 25 mg de prostaglandina (Lutalyse). El día 7 en la mañana se retiró el dispositivo intravaginal de progesterona. Al día siguiente (día 8), a las 06h00 se colocó un parche detector de celo y en la tarde se aplicó 0,25 mg de gonadorelina (Fertagyl). El día 9 en la mañana se realizó la primera inseminación artificial y en la tarde la segunda IA, la colecta de los embriones se ejecutó en el día 16 del protocolo (**Figura 3**).

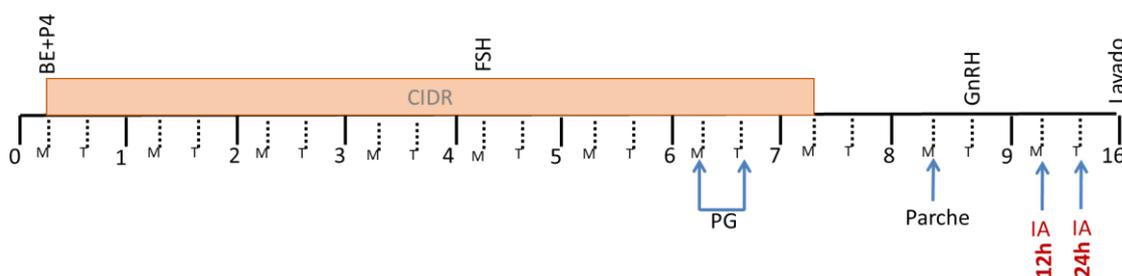


Figura 3. Esquema del protocolo de superovulación por vía epidural. BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. CIDR=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH=Hormona folículoestimulante. PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Gonadorelina. IA= inseminación artificial. Lavado=colecta de embriones.

Valoración de la concentración de FSH en plasma

En ambos tratamientos a partir del día 4 hasta el día 7 se tomaron muestras de sangre (5 ml) por venopunción de la vena yugular en tubos Vacutainer con EDTA. El inicio del muestreo fue a las 06h00 (antes de la aplicación de FSH) y se tomaron muestras seriadas: 0, 2; 4; 12; 24; 26; 28; 36; 48; 50; 52; 60; 72; 74; 76; 84 horas. Una vez tomadas las muestras, estas fueron colocadas en un cooler con hielo, luego centrifugadas a 1.000 g x 15 min. Las muestras de plasma se congelaron a -20°C y posteriormente fueron analizadas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Planificación del horario para la toma de muestras sanguíneas.

Día 4		Día 5		Día 6		Día 7	
Hora	Muestra	Hora	Muestra	Hora	Muestra	Hora	Muestra
06:00	0	06:00	24	06:00	48	06:00	72
08:00	2	08:00	26	08:00	50	08:00	74
10:00	4	10:00	28	10:00	52	10:00	76
18:00	12	18:00	36	18:00	60	18:00	84

Fuente: Autores

La cuantificación de la concentración de FSH se realizó por inmunoensayo enzimático competitivo usando el kit (Bovine follicle-stimulating hormone (FSH) Elisa). La dosis mínima detectable de FSH bovina según el fabricante fue inferior a 2 mUI/ml. Precisión intra-ensayo: CV%<15%, precisión entre ensayos: CV%<15%.

Los resultados obtenidos según la casa comercial del kit de Elisa utilizado se encontraban en mUI/ml; sin embargo, en la mayoría de estudios la unidad de medida en la que se expresan la concentración de la FSH es ng/ml; por tal motivo, se transformaron las mUI/ml a ng/ml, considerando que 1 mUI/ml equivale a 0,047 ng/ml. Por lo antes indicado, los resultados del presente estudio serán presentados en ng/ml.

Valoración de la respuesta superovulatoria y de la ovulación

Para valorar la respuesta superovulatoria se cuantificaron el número de folículos (>8 mm) presentes en cada uno de los ovarios, mediante ecografía previo a la primera inseminación artificial en la mañana en el día 9 del protocolo de SOV. La ultrasonografía se realizó con un ecógrafo portátil (Prosound2), provisto de sonda lineal, con una frecuencia de 7,5 MHz, siempre por el mismo técnico.

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

realizó con un ecógrafo portátil (Prosound2), provisto de sonda lineal, con una frecuencia de 7,5 MHz, siempre por el mismo técnico.

Preparación del animal previo al proceso de recolección de embriones

La donadora fue colocada en una manga cumpliendo las respectivas medidas de bioseguridad, tanto para el operador como para el animal. Luego se procedió a realizar la asepsia y antisepsia del tren posterior del animal con agua y amonio cuaternario. A continuación, se localizó y preparó el lugar donde se aplicó un anestésico (mezcla de 4,5 cc de lidocaína al 2% + 0,4 cc de xilacina) por vía epidural (última sacra y primera coccígea).

La recuperación de embriones se realizó al día 16 del protocolo, es decir, 7 días posteriores a la inseminación artificial, mediante la técnica no quirúrgica. Para lo cual primero se pasó una sonda Foley hasta la curvatura mayor del cuerno derecho en donde se procedió a inflar el balón con la cantidad de aire necesario para cada caso. Luego se sacó el mandril y se conectó el sistema de lavado de dos vías, una de las vías se conectó al medio de lavado y la otra a un filtro de colecta. Una vez realizado el lavado uterino, el filtro fue transportado para su evaluación. Este procedimiento se repitió en cada cuerno uterino.

Valoración de los embriones obtenidos

Una vez realizado el lavado de los embriones, estos fueron colocados en una caja Petri de búsqueda y posteriormente evaluados mediante un estereoscopio, determinando su grado de desarrollo y su calidad, de acuerdo con los parámetros establecidos por la International Embryo Transfer Society (2010).

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados en Excel y analizados en el programa estadístico SPSS versión 25. Se realizaron estadígrafos principales de todas las variables. Se evaluó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro wilk. El análisis de la variable concentraciones de FSH fue realizada mediante la prueba de ANOVA y sus medidas comparadas con la prueba de Tukey al 5%. La respuesta a la SOV, el número de ovulaciones y embriones obtenidos fueron analizados con la prueba de T de Student. Y el análisis de la calidad y estadio de desarrollo de los embriones se llevó a cabo con la prueba de Chi-cuadrado.

Resultados y discusión

Peso, condición corporal (CC) y recuento de folículos antrales

Las hembras de ambos grupos presentaron pesos promedios similares (T1=542,5 ± 47,10 y T2=541,5 ± 55,93 Kg); además, estos animales poseían una condición corporal de 2,8 ± 0,10 (T1) y 2,7 ± 0,11 (T2) con un recuento de folículos antrales antes de la aplicación de FSH de 17,3 ± 3,42 para T1 y 16 ± 2,12 para T2; **Tabla 2**). Estos resultados demuestran la homogeneidad de las donadoras en los dos tratamientos evaluados.

Tabla 2. Características generales de las donadoras previo al inicio de los tratamientos de superovulación.

VARIABLES	N	T1	T2	P
Peso (kg)	4	542,5 ± 94,21	541,5 ± 111,87	ns
Condición Corporal (escala de 1 a 5)	4	2,8 ± 0,2	2,7 ± 0,24	ns
Recuento Folículos Antrales (n)	4	17,3 ± 6,84	16 ± 4,24	ns

T1=intramuscular. T2=epidural. P=significancia estadística entre grupos. Prueba de T de Student.

Concentración de la hormona Folículo-estimulante (FSH) post aplicación de una dosis única de 200 mg de FSH vía epidural

En el presente estudio se observó que antes de aplicar la primera dosis de FSH, en el día 4 del protocolo a la hora 0 (06h00) la concentración de esta hormona fue similar ($p>0,05$) en ambos tratamientos T1 (1,40 ± 0,20 ng/mL) y T2 (1,25 ± 0,08 ng/mL). Estos valores se encontraban dentro de los niveles basal para la especie bovina 1,5 ng/ml de FSH reportado por Chasombat et al. (2013).

Sin embargo, después de la aplicación intramuscular y epidural de FSH, la concentración de la hormona se elevó 14,80 veces en T1 (20,75 ng/mL) y 20,20 veces en T2 (25,46 ng/mL) a las 2 horas, sin diferencia entre tratamientos ($p>0,05$). Estos valores son concordantes con los descritos por Chumchai et al. (2021), quienes reportaron que la FSH administrada vía epidural proporcionaba valores superiores a 25 ng/mL después de 10 horas posteriores a la aplicación de la hormona.

La evidencia científica describe que el protocolo ideal de superovulación requiere que la FSH circulante mantenga niveles superiores a los 2,5 ng/mL al menos por 72h, para que el

crecimiento de los folículos se mantengan constante y sostenido hasta que alcancen el tamaño 8 mm y adquieran la capacidad para ovular (Gabriel Bó & Mapletoft, 2020).

El nivel más alto de FSH en ambos tratamientos se observó a las 4 horas (10h00) y luego se observó una disminución constante hasta la toma de las 24 horas, post aplicación de FSH (Figura 4).

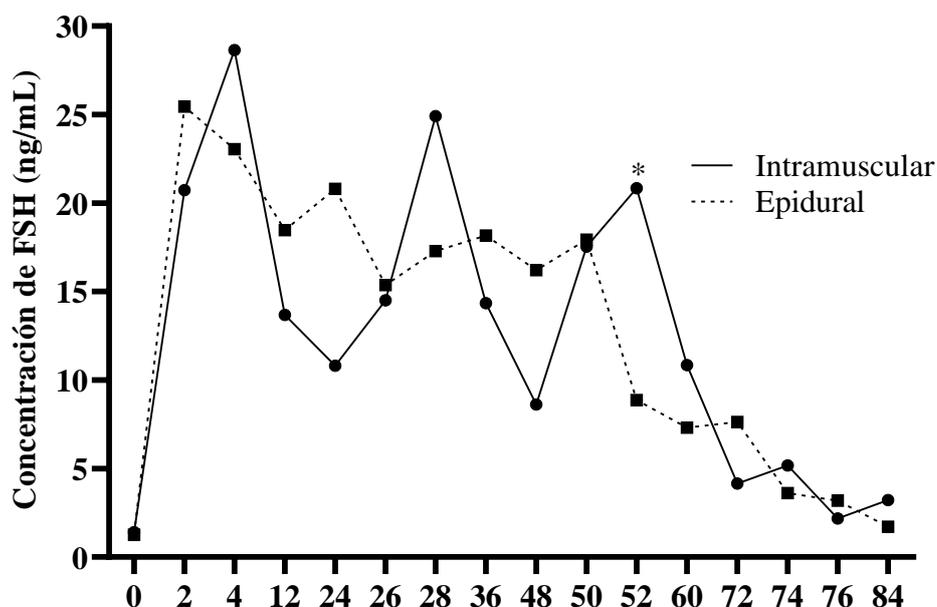


Figura 4. Concentración media de FSH en T1 (intramuscular) y T2 (epidural) valorada a partir del día 4 a las 0; 2; 4; 12; 24; 26; 28; 36; 48; 50; 52; 60; 72; 74; 76; 84 horas.

En el quinto día del protocolo previo a la administración de FSH (24h) en T1 la concentración de FSH fue la mitad ($10,80 \pm 8,21$ ng/mL) de la observada en T2 ($20,80 \pm 10,05$ ng/mL), lo cual es indicativo de que la vía epidural permite mantener una liberación lenta y constante de la FSH comparada con la intramuscular (Bernards, 2002). Probablemente esto sea debido a la cantidad de grasa que posee el espacio vertebral que disminuyó la absorción de la hormona; así como también a la cantidad y disponibilidad de venas epidurales y a la solubilidad de la sustancia aplicada por esta vía (Lee et al., 2003).

De manera similar en el sexto día, la concentración hormonal previo a la administración de FSH (48h) en T1 ($8,63 \pm 4,11$ ng/mL) presentó 1,87 veces menos hormona en comparación con T2 ($16,22 \pm 7,47$ ng/mL); sin embargo, 2 horas después (50h) de la administración de FSH vía IM en T1 los valores se igualaron a los observados en T2 ($17,54 \pm 7,15$ ng/mL; $17,94 \pm 7,28$ ng/mL respectivamente). Por lo tanto, la concentración de FSH mantuvo en niveles similares hasta las 50 horas en los dos tratamientos como se puede observar en la **Figura 4**.

En la décimo primera valoración (52h) fue la única vez que se observó diferencia estadística ($p < 0,05$) entre T1 ($20,83 \pm 3,23$ ng/mL) y T2 ($8,86 \pm 1,77$ ng/mL), llegando a presentar 2,3 veces menos concentración que las donadoras de T1. Esta particularidad indica que la administración de 200 mg de FSH vía epidural, en una sola dosis, permite mantener concentraciones elevadas de esta hormona hasta 50 horas post aplicación, esta disminución drástica de la hormona podría explicar el gran número de folículos que no llegaron a ovular en T2, basado en el principio de la necesidad de que los niveles de FSH se mantengan altos por al menos 72h para que alcancen tamaño y capacidad para ovular (Bó & Mapletoft, 2020) para luego bajar a niveles basales.

Recuento de folículos antrales valorados en el día 0 y 9 del protocolo de superovulación

No se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) en cuanto al número de folículos antrales al inicio del protocolo entre los tratamientos T1 ($17,3 \pm 3,42$) y T2 ($16 \pm 2,12$; **Figura 5; Panel 1**). Estos resultados son similares a los valores establecidos ($17,5 \pm 0,85$ folículos) para vacas de la raza Holstein alimentadas bajo un sistema pastoril en el trópico alto ecuatoriano (Araujo & Cordero, 2021) y $17,26 \pm 0,38$ folículos (Ayala et al., 2022). Los mismos que concuerdan con los observados por Mossa et al. (2012) en un estudio realizado en la zona alta de Irlanda, determinando una media de $18,5 \pm 9,0$ folículos antrales.

Sin embargo, en otras investigaciones realizadas en ganado Holstein alimentadas en sistemas intensivos y en condiciones tropicales se establecen un recuento de folículos antrales (RFA) superior al del presente estudio, por ejemplo Furukawa et al. (2020) encontraron $27,2 \pm 12,2$ folículos, mientras que Gobikrushanth et al. (2017) reportaron $26 \pm 1,0$ folículos.

La diferencia en el RFA observados en los trabajos antes indicados podría estar relacionados con las características propias de la zona, ya que existe evidencia científica que describe que vivir en regiones altas (3.000 m s.n.m) afecta negativamente algunas funciones corporales como la reproductiva en humanos (Verratti & Di Giulio, 2012), además, la hipoxia hipobárica y el estrés oxidativo que sufren los ovinos en zonas altas influye en el funcionamiento del eje hipotálamo, hipófisis, ovarios, comprometiendo la foliculogénesis, crecimiento del cuerpo lúteo y la expresión de los genes IGF-I y IGF-II (Parraguez et al., 2013), llegando a reducir la fertilidad de estos animales, en comparación con los que viven a nivel del mar (Parraguez & Gonzalez, 2020)

Si bien no existen trabajos en la especie bovina que relacionen la hipoxia y la fertilidad, hay estudios que describen cambios en la fisiología ovárica del bovino Criollo en la sierra del

Ecuador (Ayala et al., 2019) que podrían estar ligados al factor piso altitudinal (hipoxia hipobárica). Sumado a esto, también hay que considerar las condiciones nutricionales propias de la zona que podrían alterar el medio metabólico y endócrino de la descendencia de estos bovinos (Santos et al., 2008), ya que, estudios de epigenética (reprogramación) describen que el medio ambiente que rodea a la madre afecta al nuevo ser durante su vida fetal, ejerciendo profunda influencia en el desarrollo, y función fisiológica del neonato (Reynolds & Caton, 2012).

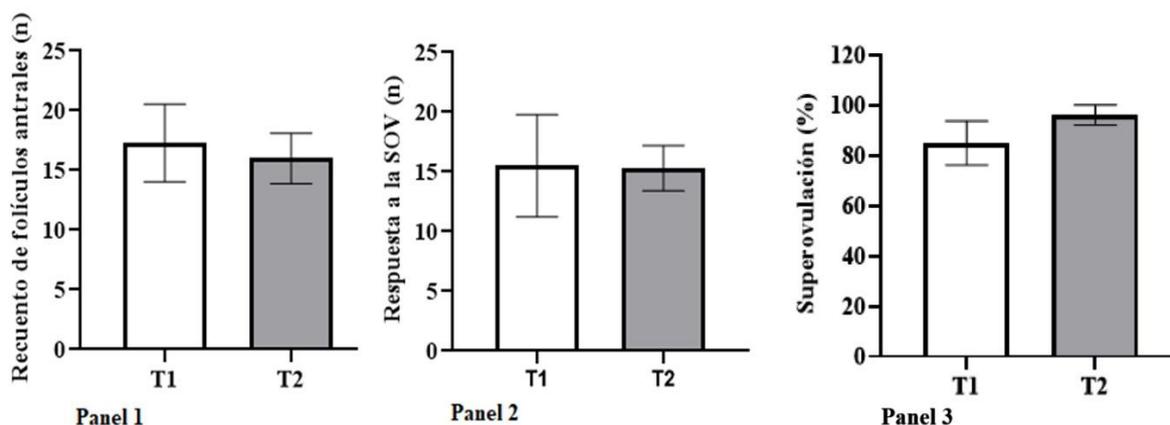


Figura 5. Media y error estándar del recuento de folículos antrales (RFA) en el día 0 (Panel 1). En el Panel 2 se describe la respuesta al protocolo de superovulación (día 9) y el porcentaje de superovulación observado (Panel 3). Prueba T de student.

En cuanto número de folículos antrales que respondieron al protocolo SOV y que fueron valorados en el día 9, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos T1 ($15,5 \pm 4,29$) y T2 ($15,3 \pm 1,89$; **Figura 5; Panel 2**). Es decir, que para T1 el 89,59% de los folículos antrales respondieron al protocolo de SOV llegando a presentar un tamaño >8 mm y en T2 el 95,62% (**Figura 5; Panel 3**).

Los resultados observados son concordantes con trabajos que describen que la respuesta a la SOV fue similar al aplicar FSH por vía intramuscular o por vía epidural, por ejemplo, Sakaguchi et al. (2018) obtuvieron una media de $18,3 \pm 7,5$ folículos en el protocolo convencional vs. $15,4 \pm 6,0$ folículos en el protocolo vía epidural y Ochea et al. (2015) determinaron una media de 14 folículos como media al evaluar un protocolo SOV alternativo (epidural) vs. el convencional (IM) en vacas Holstein.

Los resultados obtenidos en T1 ($15,5 \pm 4,29$ folículos; **Figura 5; Panel 2**) en el presente estudio fueron similares a los resultados reportados por Chumchai et al. (2021) quienes al evaluar dos vías de administración de FSH (IM=Convencional y Epidural) en un protocolo

SOV, obtuvieron un promedio de $17,1 \pm 1,5$ folículos ≥ 9 mm para el grupo control, pero ellos describieron un número menor de folículos que respondieron a la SOV al aplicar FSH vía epidural ($8,5 \pm 1,5$) en comparación al tratamiento T2 de nuestra investigación ($15,3 \pm 1,89$; **Figura 5; Panel 2**).

Diámetro de folículos visualizados en el día 9 del protocolo de SOV

La capacidad ovulatoria de un folículo se adquiere cuando este llega a tener un tamaño igual o superior a 8 mm (Ginther, 2016), sin embargo, para López et al. (2022) la capacidad ovulatoria de un folículo dominante en vacas *Bos taurus* se adquiere cuando este ha alcanzado un diámetro aproximado de 10 mm. Basados en este principio, se considera que el tratamiento alternativo vía epidural de nuestro estudio (T2) estimuló el crecimiento de folículos en la fase de reclutamiento hasta la etapa de dominancia y estos resultados fueron similares al tratamiento convencional intramuscular (T1), sin diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre tratamientos T1 ($11,9 \pm 0,49$ mm) y T2 ($10,8 \pm 1,49$ mm; **Figura 6**). Estos valores coinciden con la media de $11,6 \pm 0,5$ mm determinadas para vacas de la raza Holstein (Duica, 2013).

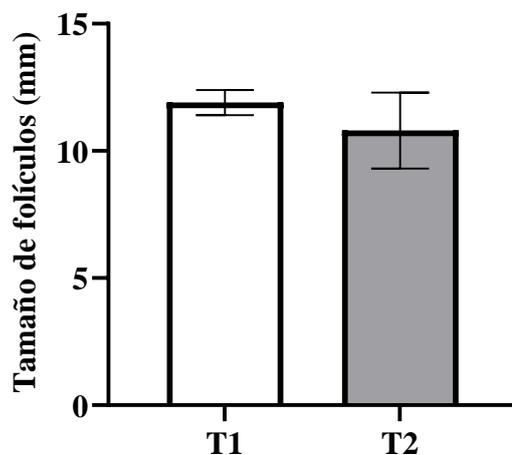


Figura 6. Media y error estándar del tamaño de los folículos que respondieron a la SOV, valorado el día 9 del protocolo. Prueba de T de Student.

Recuento y diámetro de cuerpos lúteos (CL) en el día 16 del protocolo de SOV

El estudio demostró que ambos tratamientos (T1 = $2,8 \pm 1,03$ y T2 = $7,5 \pm 3,7$) no se diferenciaron estadísticamente en cuanto al número de CL presentes, pero se encontró diferencia numérica que indica un mayor número de ovulaciones en T2 (**Figura 7; Panel 1**). Sin embargo, en otros trabajos de nuestro grupo de investigación se ha observado que un protocolo convencional ($14,4 \pm 1,7$) proporciona un mayor número de CL en comparación con

el protocolo vía epidural ($7,8 \pm 1,9$) con dosis de 400 mg y 200 mg de FSH respectivamente (Araujo & Cordero, 2021), igual reporte emitieron Chumchai et al. (2021) cuando la dosis de FSH en el protocolo alternativo fue de 400 mg (convencional = $15,3 \pm 1,0$ CL y epidural = $8,5 \pm 1,3$ CL).

El cuerpo lúteo desempeña un rol muy importante en el ciclo estral de la hembra, su función principal es la producción de progesterona (P4), hormona que regula la fertilidad y mantiene la preñez (Okuda et al., 2001). Herzog et al. (2010) indicaron que el CL se forma posterior a la ovulación y tiene tres fases, la fase de crecimiento en donde el CL duplica su tamaño en los próximos 4-7 días, la fase estática en el cual el CL mantiene su dimensión hasta el día 16, para finalmente disminuir su volumen lentamente en la llamada fase de regresión.

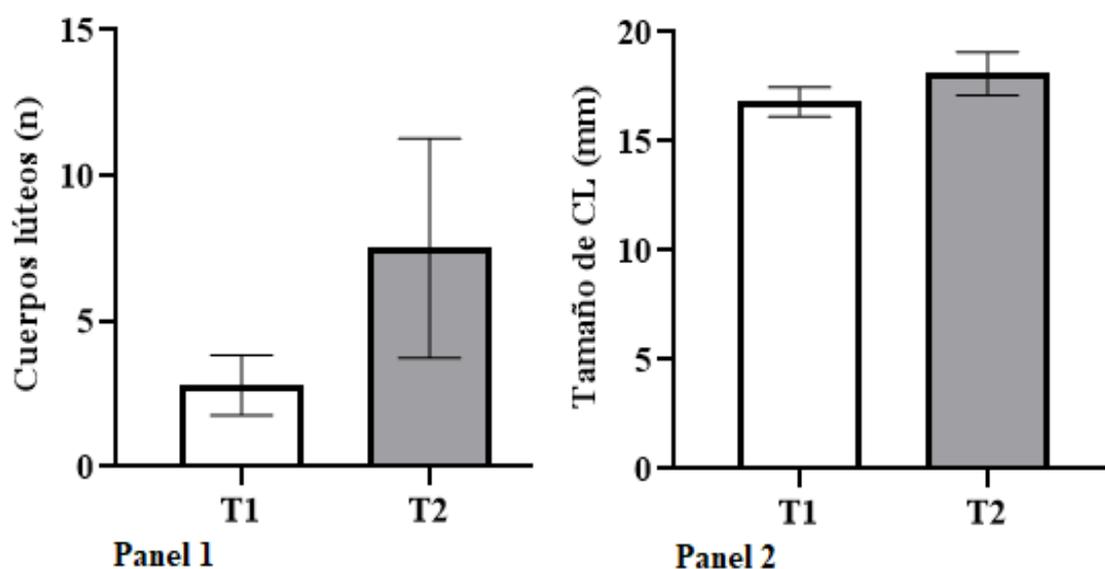


Figura 7. Media y error estándar del número de cuerpos lúteos observados en los dos tratamientos el día 16 del protocolo (Panel 1). Tamaño medio de los cuerpos lúteos contabilizados el día 16 (Panel 2). Prueba de T de Student.

La valoración del diámetro del CL en este trabajo se realizó en el día 7 post ovulación y no se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre tratamientos (T1= $16,80 \pm 0,68$ mm y T2= $18,1 \pm 0,99$ mm; **Figura 7; Panel 2**). Los resultados encontrados son inferiores a los determinados por Chumchai et al. (2021), quienes evaluaron dos protocolos de SOV el convencional y el epidural, y observaron un tamaño promedio de cuerpos lúteos de $24,1 \pm 1,1$ mm y $19,6 \pm 1,3$ mm respectivamente; posiblemente esto se debe a que en nuestro estudio se utilizaron 300 mg de FSH para el protocolo convencional y 200 mg para el alternativo en

comparación con los 400 mg de la hormona utilizados en los dos protocolos por los autores mencionados.

Recuento y diámetro de folículos que no ovularon en el día 16 del protocolo SOV

Al evaluar el número de folículos que no llegaron a ovular no se encontró diferencia ($p < 0,05$) entre los tratamientos ($T1 = 12,8 \pm 4,33$ y $T2 = 7,50 \pm 2,59$; **Figura 8; panel 1**). Los resultados observados en el presente estudio difieren de los reportados por Araujo & Cordero, (2021) quienes observaron que los animales que recibieron FSH vía epidural presentaron mayor número de folículos anovulatorio ($6,6 \pm 1,46$) en comparación con el tratamiento convencional ($2,6 \pm 0,87$). Es importante señalar que el tamaño de los folículos que no ovularon (**Figura 8; panel 2**) fue similar entre tratamientos T1 ($12,60 \pm 0,51$ mm) y T2 ($11 \pm 1,44$ mm).

Los problemas en la ovulación de las vacas generalmente se asocia a la edad, nutrición, condición corporal y enfermedades reproductivas entre otros (Chamba et al., 2017; Wrzecińska et al., 2021). Sin embargo, hoy en día es ampliamente conocido que los folículos preovulatorios no ovulan a consecuencia de un desequilibrio neuroendocrino en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas causado por un factor estresante (Rutter & Russo, 2010).

Está demostrado que el estrés activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical (Mormède et al., 2007), el cual a su vez modifica la secreción de gonadotropinas, que modulan la función del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Stock & Fortune, 1993). Por lo tanto, la presencia de un factor estresante obliga al hipotálamo a secretar hormona liberadora de corticotropina (CHR) y vasopresina (VP) (Minton, 1994) que provoca la liberación de hormona adenocorticotrópica (ACTH) en la hipófisis, la que estimula a la corteza suprarrenal para que libere glucocorticoides, principalmente cortisol (Chen et al., 2015). El cortisol inhibe la liberación de los esteroides sexuales (estradiol y progesterona) generando un bloqueo en la producción de gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH) (Fernandez et al., 2020).

Cuando el estrés coincide con la presencia de un folículo preovulatorio los glucocorticoides producidos suprimen el efecto de retroalimentación del estrógeno sobre la liberación de GnRH y posteriormente la de LH (Rutter & Russo, 2010), motivo por el cual el folículo preovulatorio no llega a ovular dando lugar a la formación de folículos anovulatorios (Cooke & Benhaj, 1989; Refsal et al., 1987).

Bajo este contexto, el alto número de folículos anovulatorios encontrados en el experimento en los dos tratamientos podría estar asociado a las múltiples punciones realizadas para extraer las muestras de sangre sobre todo al hacerlo en la vena yugular (estrés por manipulación), que en una SOV comercial no se realiza.

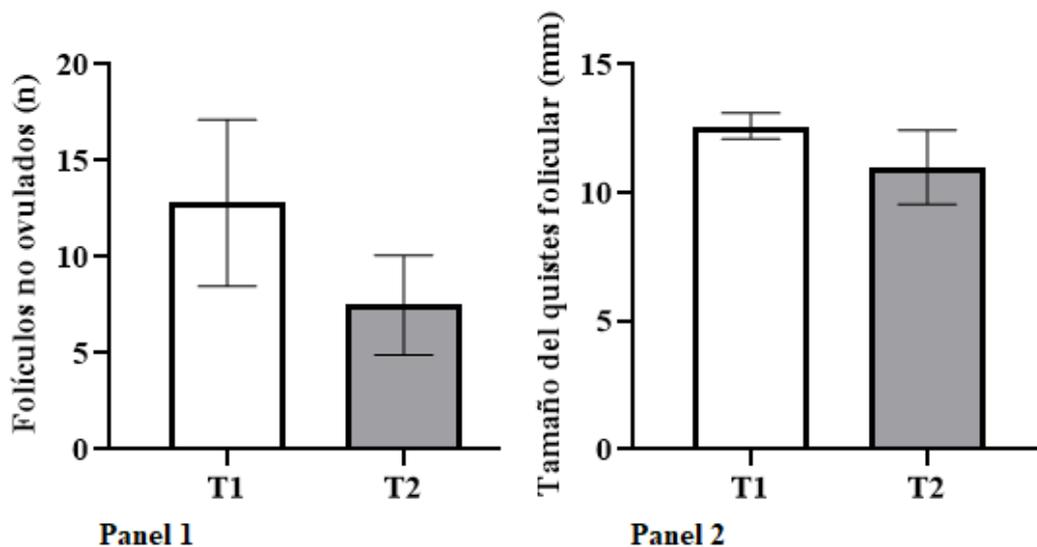


Figura 8. Media y error estándar del número (Panel 1) y tamaño (Panel 2) de los folículos que no ovularon en los dos tratamientos en el día 16 del protocolo. Prueba de T de Student.

Recuento de estructuras y embriones colectados en el día 16 del protocolo de SOV

En el día 16 del protocolo se colectaron un número similar de estructuras en los dos tratamientos T1 ($1,8 \pm 0,9$ estructuras) T2 ($4,8 \pm 3,0$ estructuras; **Figura 9; Panel 1**), los datos difieren de Sakaguchi et al. (2018) quienes evidenciaron un número similar de estructuras encontradas para los tratamientos convencional ($18,3 \pm 5,4$) y epidural ($10,90 \pm 7,60$). Sin embargo, se acercan más a los resultados obtenidos por Chumchai et al. (2021) de $8,6 \pm 1,4$ estructuras recolectadas para el protocolo convencional y $4,9 \pm 2,0$ para el protocolo epidural.

Los embriones transferibles obtenidos fueron en promedio T1 ($0,5 \pm 0,3$ embriones) y T2 ($3,8 \pm 2,6$ embriones), sin diferencia entre tratamientos (**Figura 9; Panel 2**). Los valores encontrados en el protocolo convencional fueron inferiores a los resultados de $6,3 \pm 1,26$ embriones encontrados por Araujo & Cordero, (2021) pero son superiores a $1,3 \pm 0,59$ embriones encontrados en el protocolo epidural por los mismos autores.

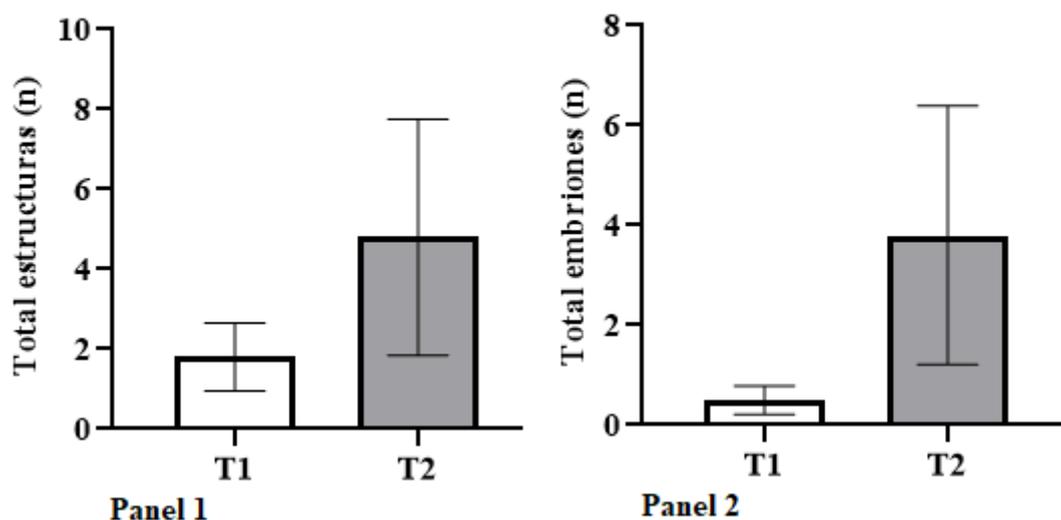


Figura 9. Media y error estándar del total de estructuras (Panel 1) y de embriones (Panel 2) colectados el día 16 del protocolo en ambos tratamientos. Prueba de T de Student.

La cantidad media de embriones transferibles recuperados en un protocolo SOV por donante en vacas lecheras, se ha mantenido casi constante en los últimos 50 años, con aproximadamente 6 embriones recuperados por programa (Mikkola, 2017). El número de embriones colectados en promedio en los dos tratamientos de este estudio es inferior al reportado en vacas lecheras. Esta diferencia está probablemente relacionada al estrés generado por las frecuentes colectas de sangre en nuestro estudio, lo cual pudo haber afectado el número de ovulaciones y, por lo tanto, el número de estructuras y embriones colectados, pero, para hacer esta afirmación es necesario el desarrollo de estudios específicos que confirmen la hipótesis.

Conclusiones

- La administración de una única dosis de 200 mg de FSH por vía epidural en vacas de raza Holstein mestizas mantuvo niveles similares de esta hormona durante 50 horas a los observados al aplicarla por vía intramuscular en un protocolo convencional; sin embargo, a las 52h los niveles de FHS en los animales que recibieron FSH vía epidural caen a valores inferiores a los necesarios para impulsar la superovulación de los folículos disponibles en las donadoras.
- El número de folículos que respondieron a la FSH administrada por vía epidural fue similar al obtenido al aplicar la hormona por vía intramuscular repartida en 8 dosis en 4 días consecutivos.
- El porcentaje de ovulación en los dos tratamientos fue similar; sin embargo, se observó un alto número de folículos que no llegaron a ovular en ambos tratamientos.

Referencias

- Apaza, A. (2017). *Anestesia epidural con asociacion de xilacina y ketamina en ovinos (Ovis aries)*.
- Araujo, D. E., & Cordero, P. C. (2021). *Efecto de la hormona foliculostimulante (FSH) en dosis unica por via epidural, para la produccion de embriones in vivo* [Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/37406/1/Trabajo de Titulacion.pdf>
- Armijo, J. a. (2003). Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. *Farmacología Humana*, 41–79. <http://www.pdcorynthia.sld.cu/Documentos/estudiantes/Absorci%F3n distribuci%F3n y eliminaci%F3n de los f%E1rmacos.PDF>
- Arriaga, J. (2010). *Transferencia de Embriones en Bovinos* [Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. https://www.academia.edu/9460808/Transferencia_de_Embriones_en_Bovinos_Revisión_SERVICIO_PROFESIONAL_QUE_PRESENTA_UNIVERSIDAD_MICHOACANA_DE_SAN_NICOLÁS_DE_HIDALGO
- Ayala, L, Pesantez, J., Rodas, E., Dután, J., Calle, J., Murillo, Y., Vázquez, J., Nieto, P., Ortega, V., & Samaniego, J. (2019). Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Archivos de Zootecnia*, 68(262), 184–190. <https://doi.org/10.21071/az.v68i262.4135>
- Ayala, Luis, Astiz, S., Dutan, J., Samaniego, J., Lopez, R., Perea, F., Hernandez, H., & Pesántez, J. L. (2022). Relationship between the concentration of anti-Müllerian hormone and antral follicle count in pasture-managed Holstein cows in the high tropics. *Journal of Dairy Research*, 89(1), 60–64. <https://doi.org/10.1017/S0022029922000140>
- Bautista, V. M., Jiménez, S. P., Meza, C. D., Ramos, T. I., & Toledo, J. R. (2019). FSH in bovine superovulation. En *Revista Bionatura* (Vol. 4, Número 1, pp. 1–5). Centro de Biotecnología y Biomedicina, Clinical Biotec. Universidad Católica del Oriente (UCO), Univesidad Yachay Tech. <https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.01.12>
- Becaluba, F. (2007). *Factores que afectan la superovulación en bovino*. 1–18. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf
- Bernards, C. M. (2002). Understanding the physiology and pharmacology of epidural and intrathecal opioids. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 16(4), 489–505. <https://doi.org/10.1053/bean.2002.0255>

- Bó, G., Carballo, D., Tribulo, A., Tribulo, H., Tribulo, R., & Mapletoft, R. (2011). Nuevos Tratamientos Hormonales Para La Superovulación De Donantes De Embriones Bovinos. *Zona Rural General Paz*, 13(50), 4–25. www.produccion-animal.com.ar
- Bó, Gabriel, & Mapletoft, R. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Bó, Gabriel, & Mapletoft, R. (2020). Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, 150(xxxx), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.001>
- Butler, S., Pelton, S., Knight, P., & Butler, W. (2008). Follicle-stimulating hormone isoforms and plasma concentrations of estradiol and inhibin A in dairy cows with ovulatory and non-ovulatory follicles during the first postpartum follicle wave. *Domestic Animal Endocrinology*, 35(1), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2008.03.002>
- Cabodevila, J., & Torquati, S. (2008). Gonadotrofina empleada: En *Bioteconología de la Reproducción*.
- Casati, L. (2000). *Efecto de la administración epidural de anestésicos locales y opioides sobre la profundidad de la anestesia* [Universidad Autónoma de Barcelona]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=4554>
- Castilho, C., Garcia, J., Renesto, A., Nogueira, G., & Brito, L. (2007). Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science*, 98(3–4), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.008>
- Castiñeiras, E. (2007). *Anestesia epidural en los bovinos mediante agonistas alfa dos adrenérgicos y opiáceos* [Universidad de Santiago de Compostela]. <http://dspace.usc.es/handle/10347/2361>
- Castro, D., & Rodríguez, D. (2014). *Evaluación de factores que afectan la producción de embriones luego de un tratamiento superovulatorio en el ganado bovino en Argentina*. Universidad Nacional de Córdoba.
- Chamba, H., Benítez, E., & Pesántez, M. (2017). Factores predisponentes para la enfermedad quística ovárica bovina y su efecto en la eficiencia reproductiva. En *Revista de Medicina Veterinaria* (Número 35, pp. 17–28). <https://doi.org/10.19052/mv.4384>

- Chasombat, J., Nagai, T., Parnpai, R., & Vongpralub, T. (2013). 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 Journal of Animal Sciences*, 26(4), 488–500. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12519>
- Chen, Y., Arsenault, R., Napper, S., & Griebel, P. (2015). Models and methods to investigate acute stress responses in cattle. *Animals*, 5(4), 1268–1295. <https://doi.org/10.3390/ani5040411>
- Chumchai, R., Ratsiri, T., Ratchamak, R., Vongpralub, T., Boonkum, W., & Chankitisakul, V. (2021). Ovarian responses and FSH profiles at superovulation with a single epidural administration of gonadotropin in the Thai-Holstein crossbreed. *Animal Reproduction*, 18(3). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2021-0053>
- Cooke, R., & Benhaj, K. (1989). Effects of ACTH and cortisol on luteolysis in the ewe. *Animal Reproduction Science*, 20(3), 201–211. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90085-7](https://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90085-7)
- Deguettes, Q., Fattal, E., Moreau, M., Lego, E., & Bochot, A. (2020). Controlled delivery of follicle-stimulating hormone in cattle. *International Journal of Pharmaceutics*, 590(July). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119904>
- Duica, A. (2013). Efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos. En *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Número 9).
- Edelman, R., Wasserman, S., Bodison, S., Perry, J., O'Donnoghue, M., & DeTolla, L. (2003). Phase II safety and immunogenicity study of type F botulinum toxoid in adult volunteers. *Vaccine*, 21(27–30), 4335–4347. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00460-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00460-2)
- Faizah, H. M. S., Richard, F., Meena, P., Stanley, K. L., Amriana, H., Alhassany, A., Yadav, S. B., Marie, L., Crouch, B., Son, B. A. R., & Saipul, B. A. R. (2018). *Multiple Ovulation Embryo Transfer (Moet) in Dairy Cattle in Gatton*. 9(2), 109–116.
- Fernandez, A., Pérez, S., Villagrà, A., Pérez, N., & Astiz, S. (2020). The effect of stress on reproduction and reproductive technologies in beef cattle—A review. *Animals*, 10(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ani10112096>
- Fonseca, J., Silva Filho, J., Pinto Neto, A., & Palhares, M. (2001). Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53(6), 671–676. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352001000600010>

- Forde, N., Beltman, M., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J., & Crowe, M. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.025>
- Franco, J., & Uribe, L. (2012). Hormonas Reproductivas de Importancia Veterinaria en Hembras Domésticas Rumiantes. *Biosalud*, 11(1), 1–16.
- Furukawa, E., Masaki, T., Sakaguchi, K., Bo, M., Yanagawa, Y., Ueda, K., & Nagano, M. (2020). Relationship between the timing of the first postpartum ovulation and antral follicle counts in Holstein cows. *Journal of Ovarian Research*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-0610-5>
- Garzón, N., Urrego, R., & Giraldo, C. A. (2007). Algunos Factores Que Afectan Los Tratamientos De Superovulación En La Transferencia De Embriones Bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2), 1900–19607.
- Ginther, O. (2016). The theory of follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 57, 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.002>
- Ginther, O., Beg, M., Bergfelt, D., Donadeu, F., & Kot, K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction*, 65(3), 638–647. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.638>
- Gobikrushanth, M., Dutra, P. A., Bruinjé, T. C., Colazo, M. G., Butler, S. T., & Ambrose, D. J. (2017). Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology*, 92, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.018>
- Hasler, J. F. (2004). Factors influencing the success of embryo transfer in the pig. *Theriogenology*, 56(8), 1311–1320. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00632-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00632-X)
- Hasler, J. F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. En *Theriogenology* (Vol. 81, Número 1, pp. 152–169). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Hasler, J., McCauley, A., Schermerhorn, E., & Foote, R. (1983). Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19(1), 83–99. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90125-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90125-5)

- Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., & Bollwein, H. (2010). Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*, *73*(5), 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.016>
- Hoedemaker, M., Prange, D., & Gundelach, Y. (2009). Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in German Holstein Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, *44*(2), 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00992.x>
- International Embryo Transfer Society. (2010). Manual of the International Embryo Transfer Society : a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. *International Embryo Transfer Society*. <https://www.worldcat.org/es/title/manual-of-the-international-embryo-transfer-society-a-procedural-guide-and-general-information-for-the-use-of-embryo-transfer-technology-emphasizing-sanitary-procedures/oclc/629876742>
- Jiménez, C. (2009). Superovulación: Estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Rev Med Vet Zoot*, *56*(3), 195–214.
- Kanitz, W., Becker, F., Schneider, F., Kanitz, E., Leiding, C., Nohner, H. P., & Pöhland, R. (2002). Superovulation in cattle: Practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reproduction Nutrition Development*, *42*(6), 587–599. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002045>
- Kimura, K. (2016). Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *Journal of Reproduction and Development*, *62*(5), 1–7.
- Kimura, K., Hirako, M., Iwata, H., Aoki, M., Kawaguchi, M., & Seki, M. (2007). Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology*, *68*(4), 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.016>
- Kolling, A. P. M. L., Brilhante, G. C., Drechmer, J., Santos, L. M., Silva, B. D. M., & Ramos, A. F. (2021). Relationship between superovulation and embryo production with ovarian follicular population before superovulatory treatment in Brazilian Bergamasca sheep. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, *73*(1), 115–122. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12105>
- Lane, E., Sweeney, T., Ryan, M., Roche, J., & Crowe, M. (2009). Relationship between serum

- gonadotropins and pituitary immunoreactive gonadotropins and steroid receptors during the first FSH increase of the estrous cycle and following steroid treatment in heifers. *Animal Reproduction Science*, 112(1–2), 66–82. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.008>
- Lee, I, Yamagishi, N., Oboshi, K., & Yamada, H. (2003). Effect of epidural fat on xylazine-induced dorsolumbar epidural analgesia in cattle. *Veterinary Journal*, 165(3), 330–332. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00247-2)
- Lee, Inhyung, Soehartono, R. H., Yamagishi, N., Taguchi, K., & Yamada, H. (2001). Distribution of new methylene blue injected into the dorsolumbar epidural space in cows. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 28(3), 140–145. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2987.2001.00042.x>
- Lonergan, P., & Boland, M. P. (2011). Multiple Ovulation and Embryo Transfer. En *Elsevier* (Vol. 2).
- López, F., Llobera, M., Palacín, R., Garcia, I., & Hunter, R. (2022). Follicular Size Threshold for Ovulation Reassessed. Insights from Multiple Ovulating Dairy Cows. *Animals*, 12(9), 1–9. <https://doi.org/10.3390/ani12091140>
- Machado, L. F., Nunes, M., & Pineschi, L. E. (2013). Alternativas hormonais para programas de transferência de embriões em bovinos. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Madrid, S., López, A., & Echeverri, J. J. (2016). Association between FSHR polymorphism with productive and reproductive traits in antioquia holstein cattle. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 69(1), 1–10. <https://doi.org/10.15446/rfna.v69n1.54747>
- Maldonado, J. G., & Bolívar, P. A. (2008). Racionalidad de los esquemas de superovulación y sincronización en la transferencia de embriones en bovinos: ¿terapéutica basada en la evidencia o ausencia de ética? *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 436–450. http://www.cundinamarca.gov.co/Cundinamarca/Archivos/FILE_ENTIDADES/FILE_ENTIDADES56133.pdf
- Mapletoft, R., Bennett, K., & Adams, G. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44(2002). <https://doi.org/10.1051/rnd:2002046>
- Marques, M. O., Silva, K. C. F., Max, M. C., Gomes, R. G., & Seneda, M. M. (2008). Principais estratégias para o incremento da te em bovinos. *Acta Sci Vet.*, 36, 36(2sup): 161-4.

- Mikkola, M. (2017). Superovulation and embryo transfer in dairy cattle – effect of management factors with emphasis on sex-sorted semen. En *Agnes Sjöbergin katu* (Vol. 2).
- Minton, J. E. (1994). Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. *Journal of animal science*, 72(7), 1891–1898. <https://doi.org/10.2527/1994.7271891x>
- Moberg, G. (1991). How Behavioral Stress Disrupts the Endocrine Control of Reproduction in Domestic Animals. *Journal of Dairy Science*, 74(1), 304–311. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78174-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78174-5)
- Mogollon, E. M., & Burla, J. A. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de fsh. *Spei Domus*, 18, 2–10.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C. G., Richard, S., & Veissier, I. (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behavior*, 92(3), 317–339. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>
- Mossa, F., Walsh, S. W., Butler, S. T., Berry, D. P., Carter, F., Lonergan, P., Smith, G. W., Ireland, J. J., & Evans, A. C. O. (2012). Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2355–2361. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4325>
- Motta, P. A., Ramirez, N. M., Ramos, N., Valencia, A. F., & Perdomo, W. (2011). Respuesta superovulatoria en numero y calidad embrionaria de vacas y novillas Gyr lechero en clima calido. *REDVET Revista Electronica Veterinaria*, 12, 1–14.
- Mugabure, B., Echaniz, E., & Marín, M. (2005). Fisiología y farmacología clínica de los opioides epidurales e intratecales. En *Rev. Soc. Esp. Dolor* (Vol. 12).
- Murphy, B., & Martinuk, S. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine reviews*, 12(1), 27–44. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-1-27>
- Narváez, P., & Tamay, M. (2013). CUANTIFICACIÓN DE HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE, HORMONA LUTEINIZANTE Y ESTRADIOL EN MUJERES DE 45 - 55 AÑOS EN ETAPA DE CLIMATERIO [Universidad de Cuenca]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=4554>
- Ochea, M., Pascal, M., Şonea, A., & Bîrţoiu, A. I. (2015). The effect of epidural administration

of FSH in bovine superovulation protocol. *Animal Science*, 58, 217–220.

Okuda, K., Uenoyama, Y., Berisha, B., Lange, I. G., Taniguchi, H., Kobayashi, S., Kobayashi, S. I., Miyamoto, A., & Schams, D. (2001). Estradiol-17 β is produced in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 65(6), 1634–1639. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.6.1634>

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

Parraguez, V. H., Urquieta, B., Pérez, L., Castellaro, G., Reyes, M. D. L., Torres, L., Aguado, A., Astiz, S., & González, A. (2013). Fertility in a high-altitude environment is compromised by luteal dysfunction: the relative roles of hypoxia and oxidative stress. *Reproductive Biology and endocrinology*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-24>

Ponce, N. (2015). Transferencia de embriones en ganado bovino [Universidad Cardenal Herrera]. En *Facultad de Veterinaria de la Universidad Cardenal Herrera* (Vol. 5). [https://repositorioinstitucional.ceu.es/bitstream/10637/7574/1/Transferencia de embriones en ganado bovino_TFG_Nuria Ponce Palau.pdf](https://repositorioinstitucional.ceu.es/bitstream/10637/7574/1/Transferencia%20de%20embriones%20en%20ganado%20bovino_TFG_Nuria%20Ponce%20Palau.pdf)Facultad

Ratsiri, T., Ratchamak, R., Chumchai, R., Boonkum, W., Vongpralub, T., & Chankitisakul, V. (2021). A novel route of follicle-stimulating hormone administration with a split-single ischiorectal fossa in thai-holstein crossbred superovulation programs under heat stress conditions. *Animal Science Journal*, 92(1). <https://doi.org/10.1111/asj.13574>

Refsal, K., Jarrin, J., & Nachreiner, R. (1987). Endocrine profiles in cows with ovarian cysts experimentally induced by treatment with exogenous estradiol or adrenocorticotropic hormone. *Theriogenology*, 28(6).

Reynolds, L. P., & Caton, J. S. (2012). Role of the pre- and post-natal environment in developmental programming of health and productivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354(1–2), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.013>

Rioja, E., Rubio, L. M., Monteith, G., & Kerr, C. L. (2013). Analgesic and motor effects of a high-volume intercoccygeal epidural injection of 0.125% or 0.0625% bupivacaine in adult cows. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 77(4), 273–280.

Rodrigues, M. C. C., Bonotto, A. L. M., Acosta, D. A. V., Boligon, A. A., Corrêa, M. N., & Brauner, C. C. (2017). Effect of oestrous synchrony between embryo donors and recipients, embryo quality and state on the pregnancy rate in beef cattle. *Reproduction*

in Domestic Animals, 53(1), 152–156. <https://doi.org/10.1111/rda.13084>

Rutter, B., & Russo, A. (2010). Dinàmica, diagnòstico y tratamiento de los quistes ovàricos en el bovino. *EMC - Tratado de Medicina*, 14(4), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(10\)70494-3](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(10)70494-3)

Sakaguchi, K., Ideta, A., Yanagawa, Y., Nagano, M., Katagiri, S., & Konishi, M. (2018). Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black cows. *Reproduction and Development*, 1–16.

Santos, J., Cerri, R., & Sartori, R. (2008). Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, 69(1), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.010>

Seidel, G. E. J., & Seidel, S. M. (1991). *Training Manual for Embryo Transfer in Cattle*. <http://www.fao.org/3/T0117E/T0117E03.htm#ch3.1%0Ahttp://www.fao.org/3/T0117E/T0117E00.htm>

Siafaka, I. (2012). Epidural and CSF pharmacokinetics of drugs. *Biology, Medicine, Chemistry*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Epidural-and-CSF-pharmacokinetics-of-drugs-Siafaka/0e4b5e21049140fa53b6816600f731eb3ed677aa>

Stock, A., & Fortune, J. (1993). Ovarian Follicular Dominance in Cattle : Relationship between Prolonged Growth of the Ovulatory Parameters. *Endocrinology*, 132(3), 1108–1114.

Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishil, H., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G., & Sasamoto, S. (1994). Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 1259–1268.

Verratti, V., & Di Giulio, C. (2012). High-altitude hypoxia and reproduction: Is there an environmental limit to the human male reproductive system? *Sport Sciences for Health*, 7(1), 39–40. <https://doi.org/10.1007/s11332-012-0110-0>

Vilcatoma, E. (2018). *Evaluación de la producción de embriones por multiovulación en vacas Brown Swiss en la estación experimental Santa Ana, Huancayo, en los años 2011-2015* [Universidad Nacional del Centro del Perú]. [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/4850/Vilcatoma Suzanabar.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/4850/Vilcatoma%20Suzanabar.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

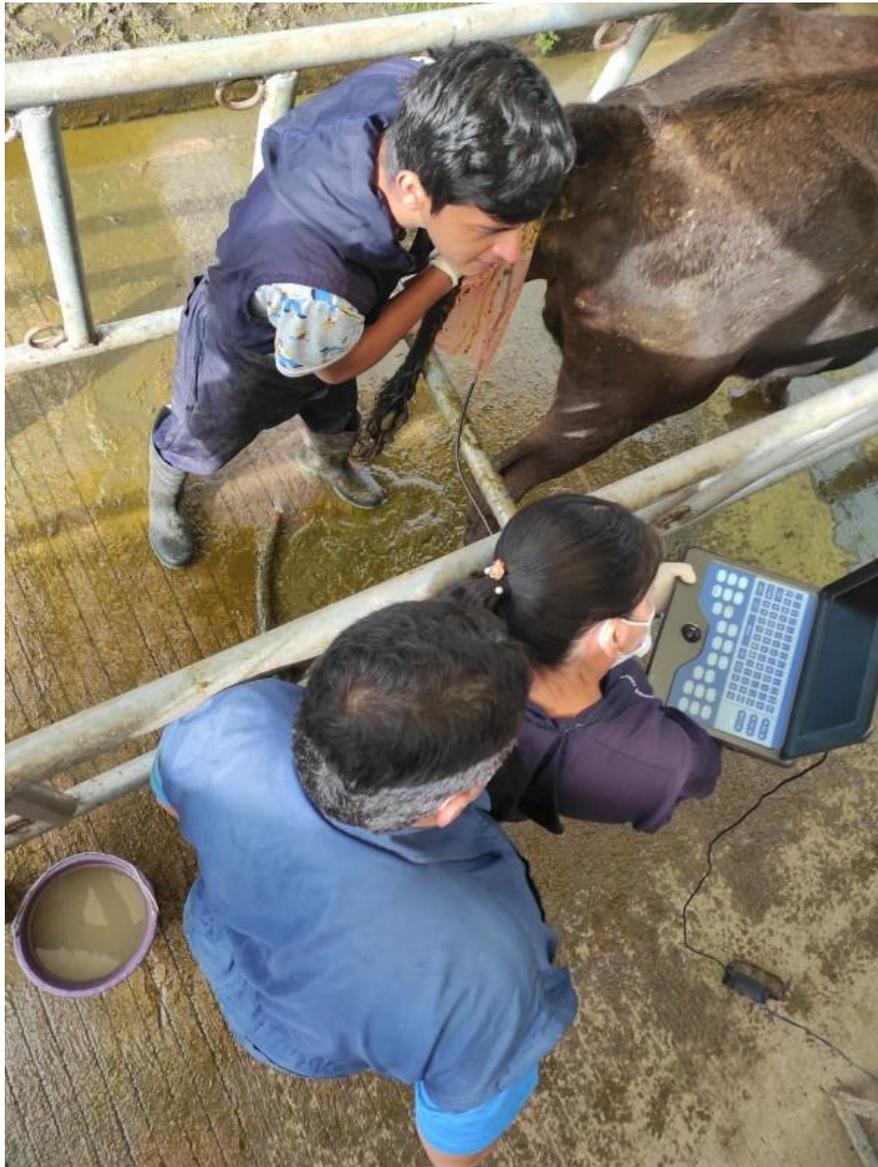
Wrzecińska, M., Czerniawska-Piątkowska, E., & Kowalczyk, A. (2021). The impact of stress and selected environmental factors on cows' reproduction. *Journal of Applied Animal*

Anexos



Anexo A: Selección de donadoras.

Fuente: Autores.



Anexo B: Recuento de folículos antrales

Fuente: Autores



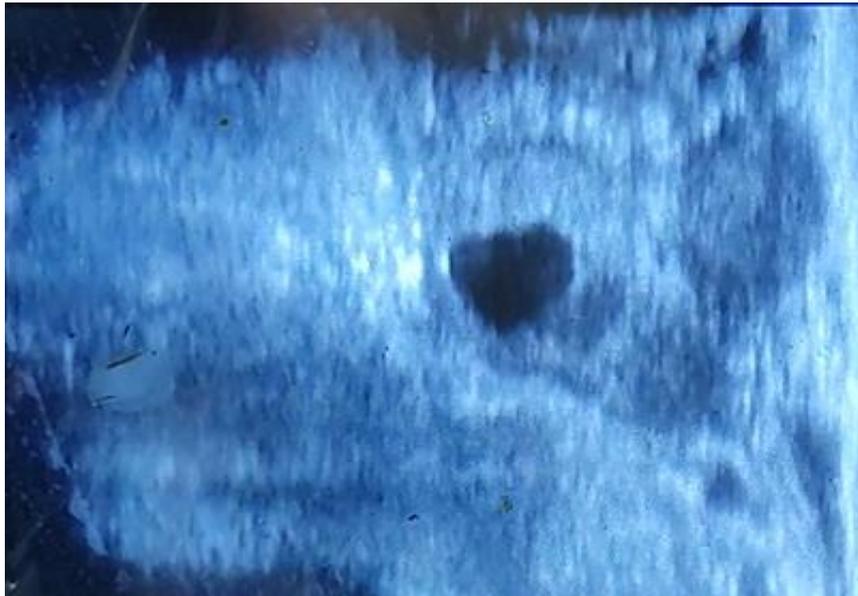
Anexo C: Observación de celo mediante monta entre vacas.

Fuente: Autores.



Anexo D: Observación de celo mediante parche detector de celo.

Fuente: Autores.



Anexo E: Observación de la presencia cuerpos lúteos (CL).

Fuente: Autores.



Anexo F: Valoración de la ovulación mediante observación de numero de CL presentes.

Fuente: Autores.



Anexo G: Preparación del material para lavado de embriones.

Fuente: Autores.



Anexo H: Insensibilización del tren posterior mediante anestesia epidural.

Fuente: Autores.



Anexo I: Proceso de recolección de estructuras.

Fuente: Autores.



AnexoJ: Recuento y valoración de embriones recolectados.

Fuente: Autores.

7.5 Valoración de los niveles de FSH en sangre



Anexo K: Extracción de muestra sanguínea.

Fuente: Autores.



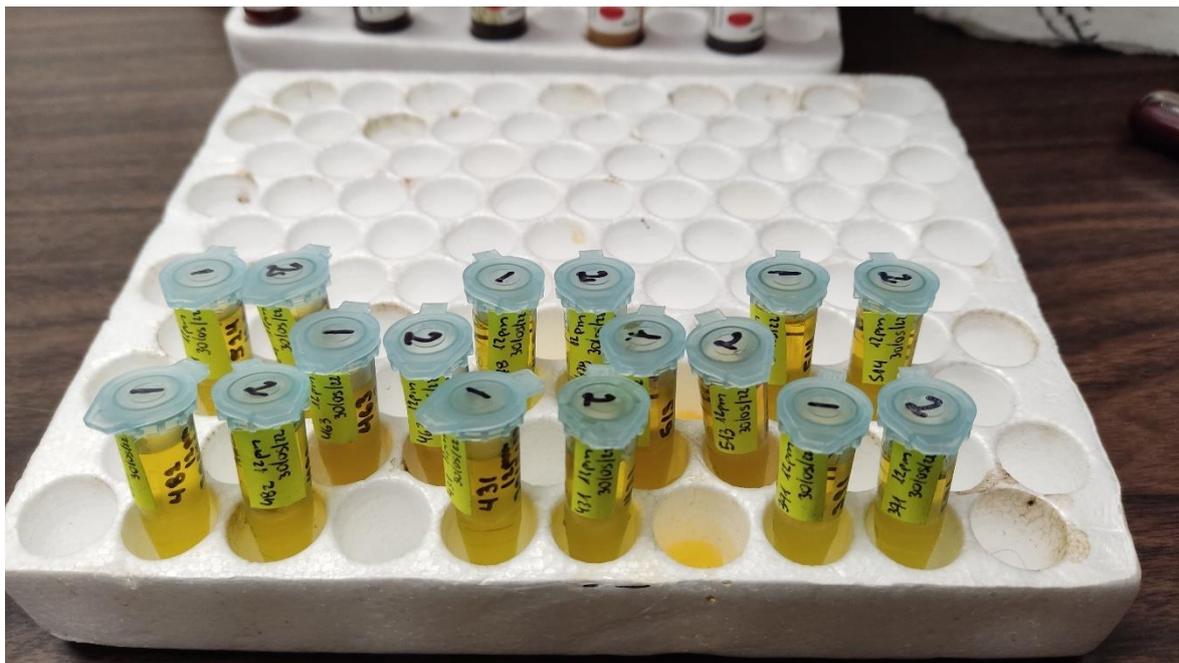
Anexo L: Centrifugación de las muestras de sangre obtenidas.

Fuente: Autores.



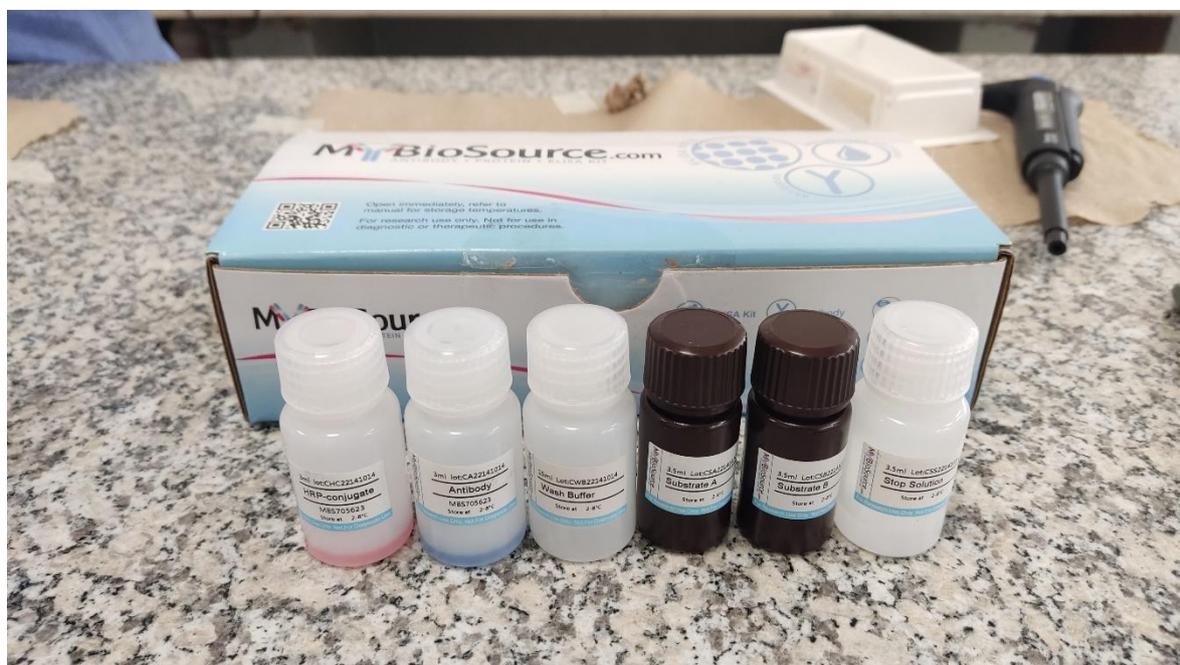
Anexo M: Extracción del plasma sanguíneo.

Fuente: Autores.



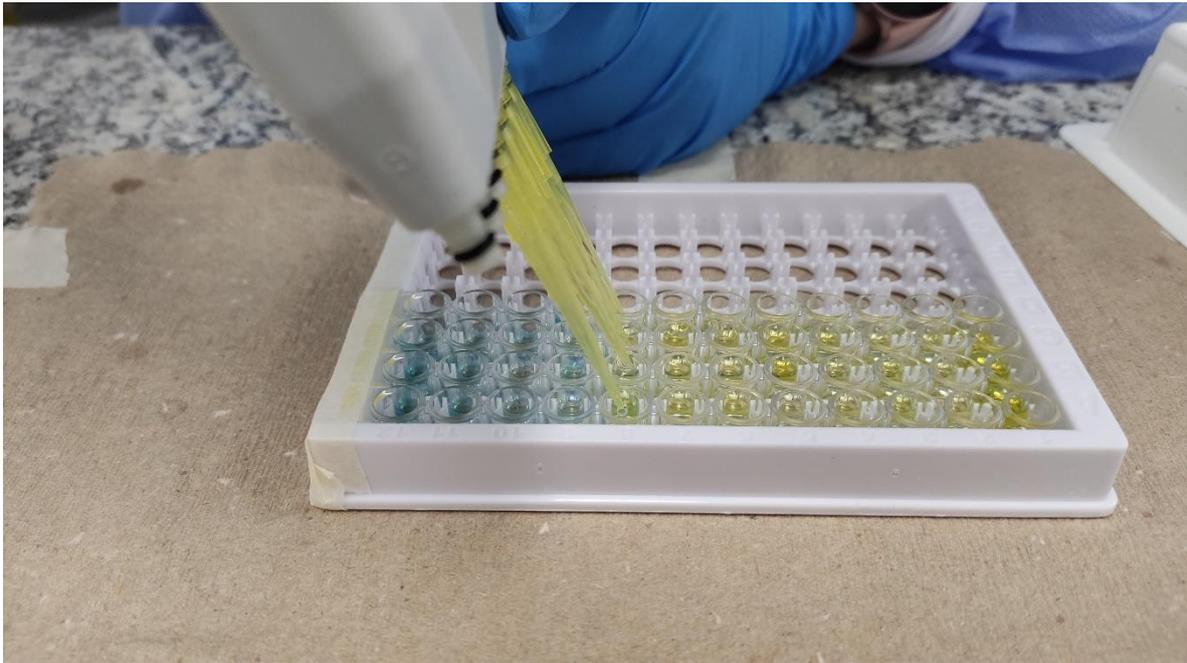
Anexo 1 N: Etiquetado del plasma sanguino obtenido

Fuente: Autores.



Anexo Ñ: Kit de Eliza utilizado para determinar los niveles de FSH.

Fuente: Autores.



Anexo O: *Uso del Kit de Elisa para determinar niveles de FSH en plasma.*

Fuente: Autores.



Anexo P2: *Lectura de los niveles de hormona FSH en plasma sanguíneo.*

Fuente: Autores.