

# UCUENCA

**Universidad de Cuenca**

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria

**Estimulación ovárica con FSH vía epidural en un protocolo de aspiración ecoguiada (OPU) en vaquillas mestizas alimentadas a base de forrajes con diferentes niveles de fibra**


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

**Autor:**

Jandry Josue Supliguicha Merchan

**Director:**

Luis Eduardo Ayala Guanga

ORCID:  0000-0001-6543-7594

**Cuenca, Ecuador**

2024-02-05

### Resumen

La investigación se realizó en una granja comercial Juticaray, ubicada en la provincia del Cañar, a una altitud 3230 metros sobre el nivel del mar. Se evaluó la respuesta a la estimulación ovárica con 250 Unidades Internacionales (UI) de Hormona Folículo-estimulante (FSH) aplicada por vía epidural en vaquillas Holstein mestizas (n=8) alimentadas con niveles altos (42 días) y bajos (28 días) de fibra en su dieta, sobre la respuesta ovárica, valorada de acuerdo al número de folículos antrales observados el día de la aspiración ecoguiada (OPU); número y calidad de complejos cúmulo ovocitos (COC´s) recuperados por la técnica de OPU. Se establecieron cuatro tratamientos: T0=testigo (pasto de 28 días); T1=pasto de 28 días + 250 UI de FSH; T2=testigo (pasto de 42 días); T3=pasto de 42 días + 250 UI de FSH. La mezcla forrajera que consumieron las vaquillas estuvo constituida por 80,08% gramíneas y 7,4% de leguminosas principalmente. Los niveles de fibra bruta fueron similares entre los pastos de 28 y 42 días ( $P>0,005$ ); sin embargo, el pasto de 28 días tuvo valores superiores de humedad, proteína bruta y cenizas con respecto al pasto de 42 días ( $P<0,05$ ). La media general de folículos visualizados el día de la OPU fue de  $20 \pm 1,07$  folículos, se llegó a aspirar un 76% ( $15,2 \pm 1,11$  folículos visualizados) y se recuperó un 60,5% de COC´s (12,1 COC´s), al clasificar el 56,2% fueron aptos y el 43,8% no aptos. El % de recuperación de COC´s del T3 fue 17,6% más en comparación con su testigo (T2) y de un 8,2% con respecto al T1. Además, el T3 se obtuvo 3 veces más COC´s aptos en comparación con T2. Se concluye que administrar 250 UI mejora el número de folículos aspirados y el número y la calidad de COC´s recuperados, sin importar la edad fenológica del pasto que consumieron las vaquillas.

*Palabras clave:* pasto, edad fenológica, vaquillas, aspiración ecoguiada



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 on a commercial farm Juticaray, located in the city of Cañar, at altitude of 3230 meters above sea level. The response to ovarian stimulation with 250 International Units (IU) of Follicle-stimulating Hormone (FSH) applied epidurally was evaluated in crossbred Holstein heifers (n=8) levels with high (42 days) and low (28 days) levels. of fiber in their diet, on ovarian response, assessed according to the number of antral follicles observed on the day of ultrasound-guided aspiration (OPU); number and quality of cumulus oocyte complexes (COC's) recovered by the OPU technique. Four treatments were established: T0=control (28-day pasture); T1=28-day grass + 250 IU of FSH; T2=control (42-day pasture); T3=42 day grass + 250 IU of FSH. The forage mixture consumed by the heifers was made up of 80.08% grasses and 7.4% mainly legumes. Crude fiber levels were similar between 28- and 42-day-old pastures ( $P>0.005$ ); However, the 28-day grass had higher values of humidity, crude protein and ash compared to the 42-day grass ( $P<0.05$ ). The overall average number of follicles visualized on the day of the OPU was  $20 \pm 1.07$  follicles, 76% were aspirated ( $15.2 \pm 1.11$  follicles visualized) and 60.5% of COCs were recovered. (12.1 COC's), when classifying 56.2% were suitable and 43.8% were not suitable. The % recovery of COCs from T3 was 17.6% more compared to its control (T2) and 8.2% compared to T1. Furthermore, T3 obtained 3 times more suitable COCs compared to T2. It is concluded that administering 250 IU improves the number of aspirated follicles and the number and quality of recovered COCs, regardless of the phenological age of the grass that the heifers consumed.

*Keywords:* grass, phenological age, heifers, ultrasound guided aspiration



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

Introducción.....	11
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivo General .....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3. Revisión de Literatura.....	14
3.1 Definición de la fibra.....	14
3.2 Importancia de la fibra en los rumiantes.....	14
3.3 Fibra, proteína, urea y su relación con la fertilidad del animal. ....	14
3.4 Ciclo estral de la hembra bovina .....	15
3.4.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario .....	15
3.4.2 Dinámica Folicular .....	17
3.5 Sincronización de la onda folicular. ....	17
3.6 Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía .....	18
3.7 Clasificación Complejos Cúmulos Ovocito .....	18
4. Materiales y métodos.....	20
4.1 Materiales.....	20
4.1.1 Materiales biológicos.....	20
4.1.2 Materiales químicos .....	20
4.1.3 Materiales de campo .....	20
4.1.4 Materiales de Laboratorio .....	20
4.2 Métodos.....	21
4.2.1 Área de estudio .....	21
4.2.2 Unidades experimentales.....	21
4.2.3 Diseño experimental.....	22
4.2.4 Valoración del número y tamaño de folículos.....	24
4.2.5 Valoración de los COC´s.....	25
4.3 Análisis estadístico.....	25

5. Resultados y discusión .....	26
5.1 Promedios generales previo a la OPU .....	28
5.2 Media del número de folículos, calidad de COC´s recuperados en las sesiones de OPU en cada uno de los tratamientos.....	29
5.3 Resultados del número de folículos y calidad de los COC´s de acuerdo al tamaño de los folículos presentes en el momento de la OPU .....	31
Conclusiones.....	33
Recomendaciones .....	34
Referencias .....	35
Anexos .....	40

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero.....	16
Figura 2. Ilustración Dinámica Folicular .....	17
Figura 3. Clasificación del ovocito.....	19
Figura 4. Mapa Satelital de la hacienda particular Juticaray .....	21
Figura 5. Protocolos de los tratamientos 0 (T0) y 1 (T1) desarrollados en praderas con fibra de 28 días de edad fenológica.....	23
Figura 6. Protocolos de los tratamientos 2 (T2) y 3 (T3) desarrollados en praderas con fibra de 42 días de edad fenológica. ....	24

**Índice de tablas**

Tabla 1. Composición botánica del pasto .....	26
Tabla 2. Composición nutricional de los pastos de 28 y 42 días de edad fenológica.....	27
Tabla 3. Media y desviación estándar general del número de folículos visualizados, aspirados, complejos cúmulo ovocito recuperados (COC's), aptos, no aptos y porcentaje de recuperación en el total de sesiones de OPU realizadas en el estudio .....	29
Tabla 4. Media y error estándar de los folículos visualizados, aspirados, complejos cúmulo ovocito recuperados (COC's), aptos, no aptos y porcentaje de recuperación en el total de sesiones de OPU realizadas en el estudio en cada uno de los tratamientos. ....	30
Tabla 5. Porcentaje de folículos de cada grupo (<4mm; entre 4-8mm; >8mm) presentes en cada uno de los tratamientos en todas las sesiones de OPU realizadas en el estudio.....	31

## Dedicatoria

Dedico este trabajo de tesis de manera muy especial a mis padres Luis y María porque siempre he contado con su apoyo incondicional y por sus enseñanzas que me han impulsado seguir adelante en el trayecto de mi vida y sobre todo en mis estudios universitarios. A mis hermanos Juan, Eduardo, Joselyn, Yonsu, Maria, Gisela y Fabian que, gracias a Dios los tengo conmigo, de manera especial a mi abuelita Rosa por ser una mujer luchadora y fuente de inspiración, además a mis amigos, compañeros y aquellas personas que de alguna u otra forma han contribuido para el logro de mis objetivos y por ultimo y no menos importante a mi mascota Lazy, aunque ya no se encuentre físicamente, sé que desde algún lugar está observando lo que un día le prometí lograr. Totalmente agradecido con todos ustedes por formar parte de mi vida, son lo que más aprecio.



## Agradecimientos

En primera instancia agradezco a mis padres Luis y María quienes han sido ejemplos a seguir en mi vida como personas de excelencia en valores, gracias por apoyarme en toda circunstancia y no dejar de creer en mí. A mis hermanos Juan, Eduardo, Joselyn, Yonsu, Maria, Gisela y Fabian por apoyarme y estar siempre presentes a lo largo de mi vida, son el motivo por el cual amo mi hogar.

De manera muy especial a mi tutor de tesis Dr. Luis Ayala por apoyarme en todo momento y mas que mi tutor ha sido un amigo al que estoy enteramente agradecido por brindar su tiempo y conocimientos en todo momento a lo largo de esta investigación, además de tenerme una paciencia. Al Dr. Andrés Jacome por brindar su tiempo para el trabajo práctico.

A los miembros del tribunal Dr. Jorge Dutan e Ing. Pedro Nieto por brindar su tiempo en la revisión de este trabajo.

Gracias a todos mis amigos, de manera especial Christian, Thais y Rosa a quienes no tengo palabras para expresar mis sinceros agradecimientos por extenderme una mano cuando más necesite.

## Lista de abreviaturas

**IGF** = Factor de crecimiento similar a la insulina

**IGF-1** = Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

**FSH** = Hormona folículo estimulante

**LH** = Hormona luteinizante

**GnRH** = Hormona liberadora de gonadotropinas

**SOV** = Superovulación

**PIVE** = Producción de embriones in vitro

**OPU** = Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía

**UI** = Unidades internacionales

**COC´S** = Complejo cúmulos ovocitos

**FDN** = Fibra detergente neutra

**FDA** = Fibra detergente acida

**LDA** = Lignina ácido detergente

**PGF2 $\alpha$**  = Prostaglandina F2 $\alpha$

**RFA** = Recuento de folículos antrales

**BE** = Benzoato de estradiol

**P4** = Progesterona.

**CC** = Condición corporal

**IM** = Intramuscular

**mm·Hg** = milímetros de mercurio

## Introducción

El estado nutricional del animal influye sobre la modulación de la fertilidad (Gutiérrez et al., 2018), específicamente sobre el desarrollo del folículo y la calidad del ovocito (Chagas et al., 2007). También se ha demostrado que la composición de la dieta influye en la competencia del ovocito (Adamiak et al., 2005), por ejemplo, dietas con altos contenidos de proteína degradable en rumen se asocia con mayores concentraciones de amonio en líquido folicular y un reducido desarrollo del ovocito (Sinclair et al., 2000).

Además, existe evidencia científica que demuestra que dietas con altos niveles de energía facilitan la disponibilidad de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) intrafolicular, esto aumenta la sensibilidad de los folículos a la hormona folículo estimulante (FSH), lo cual sumado al aumento periférico de Insulina e IGF-1 influyen en el desarrollo del folículo dominante; sin embargo, está descrito que grandes cantidades de proteína provocan disminución de la calidad de ovocito por aumento de la concentración plasmática de urea (Armstrong et al., 2001).

Lamentablemente, en las ganaderías del centro sur del Ecuador la recria es alimentada al pastoreo con mezclas forrajeras de gramíneas, leguminosas y malezas que no cubren los requerimientos nutricionales (Nieto et al., 2017), y durante su asimilación modifican las concentraciones de metabolitos en sangre, efecto que interviene sobre los parámetros reproductivos en bovinos de interés lechero (Rodas et al., 2017). Además, se ha demostrado una reducción en el recuento de folículos antrales (RFA) en los ovarios (Ayala et al., 2019), factor que influye negativamente en los resultados obtenidos al aplicar biotécnicas reproductivas como la superovulación (SOV), la aspiración ecoguiada (OPU) y la producción de embriones *in vitro* (PIVE).

Para mejorar los resultados de biotécnicas como la OPU se han realizado varios trabajos que han probado protocolos de sincronización de la onda folicular previos a cada sesión; además, han probado la estimulación ovárica con gonadotropinas con la finalidad de mejorar la calidad y cantidad de COC's recuperados (Ayala et al., 2020); así por ejemplo se valoró la estimulación con 200 mg FSH, divididas en cuatro administraciones vía intramuscular en dos días consecutivos 72 horas antes de la OPU y la administración de FSH 200 mg y 300 mg mezclados con hialurano al 5% administrado en dosis única, llegando a determinar que en los dos tratamientos mejoraron el número y calidad de COC's comparado con los grupos testigos que no recibieron FSH (Vierira et al., 2014); sin embargo, aplicar 4 dosis de FSH consecutivas pueden provocar estrés en las donadoras, esto desencadena la producción de cortisol, el cual bloquea la secreción de LH y FSH hormonas necesarias para el desarrollo de folículos y la madurez del ovocito (Chen et al., 2015). La alternativa de administrar una sola dosis de FSH por varias vías alternativas es prometedora (Sakaguchi et al., 2018).

En el contexto, en los últimos años en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca se ha probado la aplicación de 200 mg de FSH vía epidural para superovular donadoras de embriones *in vivo* de genotipo Holstein y se determinó que hay más número de folículos y de mayor tamaño que los obtenidos mediante la aplicación de 8 dosis de FSH (Farías et al., 2023), esto lleva a pensar que administrar vía epidural 250 mg de FSH impulsaría el crecimiento sostenido de los folículos antrales por 48 horas consecutivas, tiempo requerido para que los folículos adquieran un tamaño entre 5-8 mm e inicien su proceso de competencia ovocitaria condicionante que es requerida antes de ser aspirados en la OPU.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Evaluar la respuesta a la estimulación ovárica con 250 UI de FSH aplicada por vía epidural en vaquillas mestizas Holstein alimentadas con niveles altos y bajos de fibra en su dieta.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la composición nutricional del pasto a 28 días y 42 días de rebrote.
- Determinar la respuesta en cuanto al número y tamaño de folículos antrales presentes el día de la OPU, luego de la estimulación ovárica con 250 UI de FSH por vía epidural en vaquillas mestiza Holstein, alimentadas con forraje con nivel bajo y alto de fibra.
- Valorar la cantidad y calidad de los COC's recuperados en cada sesión de OPU, en vaquillas mestizas Holstein con o sin estimulación ovárica, alimentadas con nivel bajo y alto de fibra.

### 3. Revisión de Literatura

#### 3.1 Definición de la fibra

La fibra está compuesta por una red tridimensional de celulosa, hemicelulosa y lignina, desde un punto de vista químico es un conjunto de elementos que no funcionan como un todo independiente. De todos los componentes de la fibra las únicas con capacidad de ser digeridas en procesos que involucran la fermentación microbiana son la celulosa y la hemicelulosa. Este concepto ha evolucionado a través del tiempo, donde en sus inicios hacía referencia a las partes no nutritivas de un alimento (Armstrong et al., 2001). Desde el punto de vista nutricional la fibra es descrita como: a) el componente que estructura la pared celular de las plantas, b) la fracción de un alimento que estimula el proceso de rumia, c) la fracción que tiene un menor porcentaje de digestibilidad y d) la parte de un alimento a ser digerido en el rumen (Chagas et al., 2007). La fibra que se encuentra contenida en un pasto está expresada por la fibra detergente neutra (FDN) y la fibra detergente acida (FDA).

La FDN es la que mide de mejor manera la capacidad de ocupación de volumen en el tracto gastrointestinal, esto hace referencia al llenado físico de un animal o el consumo de materia seca (MS), por lo que concierne a la FDA es la fracción que se correlaciona negativamente con la digestibilidad de un pasto y su capacidad de aporte de energía, por tal motivo el contenido de FDA nos permite determinar el aporte energético de un forraje (Gutiérrez et al., 2018).

#### 3.2 Importancia de la fibra en los rumiantes

La fibra tiene una vital importancia sobre el funcionamiento ruminal, las condiciones ruminales, la rumia y como nutriente. En cuanto al funcionamiento ruminal la fibra contribuye al llenado y estimulación de las contracciones ruminales, también al mantenimiento del pH ruminal mediante la estimulación de la secreción salivar al momento de la rumia, como nutriente depende mucho de los porcentajes de fibra La fibra tiene una vital importancia sobre el funcionamiento ruminal, las condiciones ruminales, la rumia y como nutriente (Sinclair et al., 2000).

#### 3.3 Fibra, proteína, urea y su relación con la fertilidad del animal.

El porcentaje de fibra contenida en una pastura que es destinada a la alimentación de los rumiantes está estrechamente relacionado con el aporte energético que tiene dicha pastura, por lo tanto, cuando el porcentaje de fibra es mayor el aporte energético de una pastura se ve disminuido, en cambio, cuando el porcentaje de fibra es menor el aporte energético de la pastura es mayor (Chagas et al., 2007).

La proteína debe de ser un nutriente importante dentro de la alimentación del animal tanto en calidad como cantidad, siendo así que un bovino necesita de proteína degradable y no degradable en el rumen. Un exceso o una falta de proteína en el animal tiene un efecto perjudicial en la fertilidad. El exceso de proteína va a ser eliminado en el excremento o ser convertido en urea en el hígado del bovino, esta urea puede ser reciclada hacia el rumen y puede ser reutilizada para la síntesis de la proteína, pero el exceso de la urea puede ser perjudicial para el útero y oviducto causando así la disminución de la fertilidad (Adamiak et al., 2005).

Cuando se suministra un exceso de proteína en la alimentación esta va a tener un efecto negativo en la fertilidad a través de sus metabolitos ya sea de modo directo o indirecto, de modo directo cuando hay una elevada concentración de urea en el tracto reproductor causando así un ambiente no adecuado para la concepción. Y de manera indirecta va a interferir en la actividad endocrina, en el metabolismo energético y mineral y también sobre el sistema inmunitario. En estudios realizados se ha observado que los animales que han sido alimentado con un exceso de proteína y que han sido inoculadas con GnRH se ha visto una disminución de progesterona y esto puede ser causado por un exceso de urea o del amoníaco sobre el desarrollo del cuerpo lúteo (Adamiak et al., 2005).

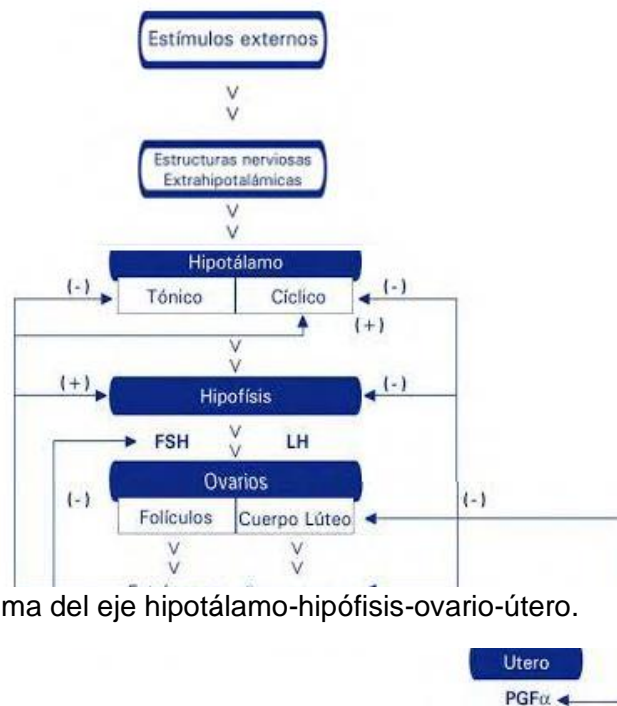
### **3.4 Ciclo estral de la hembra bovina**

El ciclo estral es la sumatoria de eventos que suceden entre estro y estro, en la especie bovina su ciclo estral tiene una duración de 18 a 24 días, siendo su promedio 21 días, en el cual sucede algunos cambios hormonales y conductuales todos estos mediados por el hipotálamo, hipófisis y ovario (Alvarez et al., 2000). En el metaestro se da la ovulación y es donde se forma el cuerpo lúteo, y el diestro es cuando el cuerpo lúteo permanece funcional, si no existe una gestación el endometrio va a secretar prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) causando una luteólisis, dando lugar a un reinicio del ciclo estral (Adams & Singh, 2014).

#### **3.4.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario**

El hipotálamo se encuentra en la base del cerebro, y esta da lugar a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), esta es difundida a los capilares del sistema hipofisario y de estos a la adenohipófisis para así estimular la síntesis y liberación de las hormonas FSH y LH expresada en la figura 1, regulado por factores como los ambientales, la nutrición y la condición corporal (Chasombat et al., 2014). En los ovarios se va a presentar el crecimiento folicular el cual va a iniciar con el incremento de la FSH, la misma que provoca un crecimiento de un grupo de 5 a 6 folículos (fase de reclutamiento), luego, un solo folículo continúa su crecimiento (fase de dominancia), lo que provoca un incremento de los estrógenos y la inhibina lo que conlleva a la atresia de los demás folículos y la disminución de la FSH. El

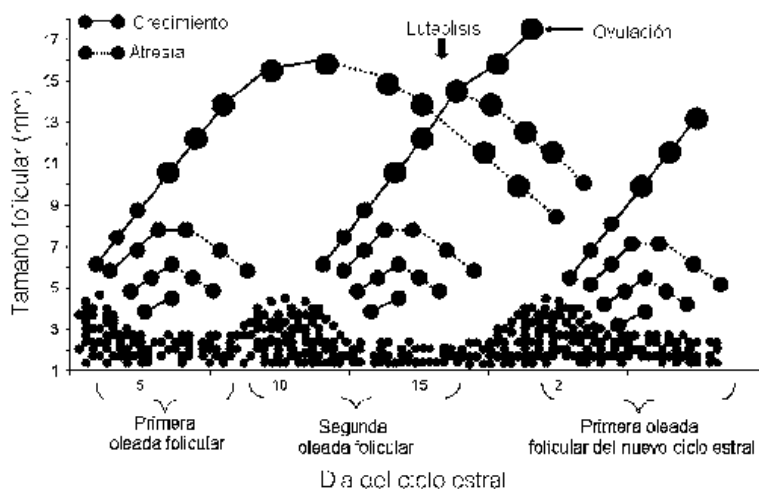
folículo dominante continua su crecimiento ya impulsado por acción de la LH, si este folículo no llega a una ovulación este se atresia y por consiguiente disminuyen los estrógenos e inhibina, dando lugar a un nuevo incremento de FSH y el reinicio de una nueva onda folicular (Martinez et al., 2016).



**Figura 1.** Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero.



### 3.4.2 Dinámica Folicular



**Figura 2.** Ilustración Dinámica Folicular.

La Dinámica Folicular es el proceso por el cual los folículos antrales continúan creciendo y en regresión que conlleva al desarrollo de folículos preovulatorios, en un ciclo estral puede aparecer dos a tres oleadas (Ayala et al., 2019). En el transcurso de la onda folicular se distinguen tres fases:

**Reclutamiento:** en esta fase un grupo de 3 a 6 folículos inician su proceso de desarrollo de un pool de folículos antrales más pequeño, estos maduran gracias a la presencia de gonadotropina específicamente del aumento de FSH, este desarrollo daría inicio a la primera onda de crecimiento folicular (Tovío, 2012).

**Selección:** se da al final de la fase de crecimiento, donde el folículo con mayor tasa de crecimiento es el que sobresale y los demás folículos terminan con la atresia de los mismos, en esta fase existe una disminución de la FSH debido a la dominancia del folículo (Xu et al., 2016).

**Dominancia:** aquí el folículo dominante actúa inhibiendo el reclutamiento evitando de esta manera la formación de una nueva cohorte de folículos, y esta inhibición se mantiene que la dominancia desaparezca ya sea porque el folículo muere o el folículo es ovulado, ya sea en la ovulación o muerte del folículo dominante se va a producir un nuevo incremento de FSH y de esta manera se inicia una nueva onda folicular (Ginther, 2016).

### 3.5 Sincronización de la onda folicular.

Para la sincronización de la onda folicular se puede realizar mediante el empleo de hormonas exógenas como el estradiol y progestágenos. Los progestágenos se asemejan a la

prostaglandina y actúan alterando la función ovárica llegando a provocar una adecuada ovulación y presencia de celo. Se debe tener en cuenta que la progesterona no inhibe la acción de la FSH (Ginther, 2019). El protocolo que se utiliza en la sincronización consiste en utilizar 2mg de BE intramuscular juntamente con la aplicación del dispositivo intravaginal con P4.

### **3.6 Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía**

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU) fue utilizada por primera vez en los bovinos a finales de 1980 en Países Bajos, pero esta técnica se empezó a utilizar de manera rutinaria en la década de los 90 (Ruiz et al., 2013). La técnica OPU ha venido teniendo un aumento considerable desde su implementación dentro de la reproducción bovina, donde un mayor número de embriones bovinos provienen de animales vivos y que además se conoce su procedencia (Sakaguchi et al., 2019). Esta técnica puede ser empleada en hembras bovinas con distintos estados fisiológicos e incluso en hembras que no responden a estimulación hormonal, también se utiliza en terneras y novillas desde el 6to-8vo mes (Ruiz, 2015).

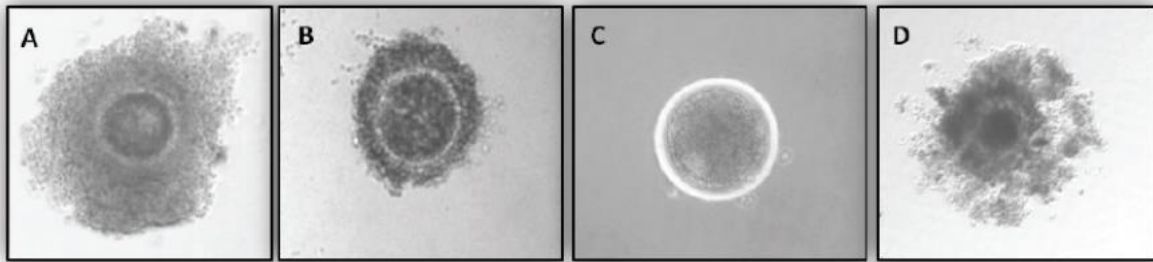
Anteriormente al realizar OPU no implicaba estimulación hormonal y generalmente se hacía dos veces por semana, esto permitía que aumente la recuperación de ovocitos ya que no existía un desarrollo folicular dominante al aspirar los folículos visibles.

### **3.7 Clasificación Complejos Cúmulos Ovocito**

Los ovocitos obtenidos por medio de procedimientos biotecnológicos (OPU) deben ser clasificados para futuros procedimientos (PIV), de esta forma poder garantizar una adecuada sobrevivencia. Para la clasificación se basa en 4 aspectos importantes los cuales van a evaluar la calidad de un ovocito que son: el estadio nuclear, las características citoplasmáticas, el aspecto de la corona radiada y la expansión de las células del cúmulo (Ayala et al., 2018).

Los primeros aspectos que se evalúan al clasificar un ovocito es la morfología del citoplasma y las células del cúmulo, ya que estos aspectos van a determinar el futuro potencial que cada ovocito va a tener durante el proceso. Estos ovocitos se clasifican en tipo A el cual presenta un citoplasma homogéneo y transparente, así también las células del cúmulo se encuentran diferentes capas (>4) y de forma compacta. El tipo B presenta un citoplasma homogéneo, pero con algunas zonas periféricas oscuras y sus células del cúmulo se encuentran varias capas (1-3). El tipo C presenta un citoplasma irregular con varias zonas oscuras y con la presencia de un cúmulo denudado, por último, el tipo D presenta un citoplasma irregular con

muchas zonas oscuras y con las células del cumulo completamente expandidas (Wu et al., 2007).



**Figura 3.** Imágenes microscópicas. Clasificación de ovocitos (Wu et al., 2007).

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Materiales biológicos

- Hormonas
  - FSH-LH (Pluset®, Calier, Buenos Aires Argentina)
  - Benzoato de estradiol (Sincroben®, Bimeda®, Monte Mor Brasil)
  - Cloprostenol (Estrogest, Livisto, Zaragoza El Salvador)
- Vaquillas de raza Holstein mestizas

#### 4.1.2 Materiales químicos

- Alcohol 70%
- Gel lubricante
- Lidocaína (Roxicaina® 2%)
- Xilacina (Overxil 2%)
- Implantes de progesterona (Biprogest, Bimeda®, Monte Mor Brasil)
- Heparina (Heparina Sódica)

#### 4.1.3 Materiales de campo

- Overol
- Guantes de inspección y chequeo ginecológico
- Jeringas de 1,3,5,10,20,50
- Toallas desechables
- Aplicador de implantes de progesterona
- Agujas desechables 18 G 1 ½, 21G 1 ½
- Tubos Falcón™ 50ml
- Equipo de ultrasonido Aloka®ProSound2 Vet
- Transductor sectorial
- Bomba de aspiración
- Sistema de Guía de Aguja
- Filtro Emcon

#### 4.1.4 Materiales de Laboratorio

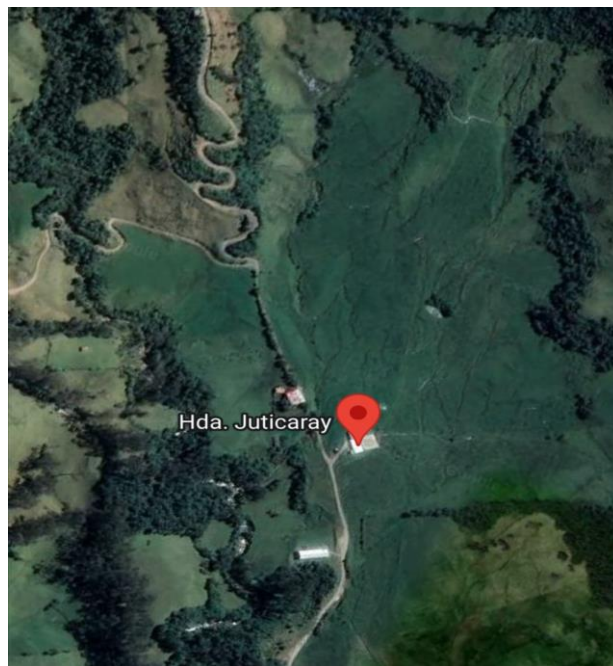
- Puntas de pipeta
- Pipeta
- Placas Petri cuadradas
- Placas Petri 90mm,30mm

- Estéreo microscopio
- Plancha de calefacción

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Área de estudio

El trabajo se realizó desde julio hasta octubre del 2023 en la granja particular Juticaray ubicada en la provincia del Cañar a una altitud 3230 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), con una temperatura que oscilan entre los 13 a 15°C.



**Figura 4.** Mapa Satelital de la hacienda comercial Juticaray (Google Maps 2023).

### 4.2.2 Unidades experimentales

Ocho vaconas Holstein mestizas con una edad entre 15-24 meses, peso medio de  $347,9 \pm 8,38$  kg y una condición corporal de  $2,7 \pm 0,03$  (CC), valorada en una escala de 1 a 5, donde 1 fue considera muy flaca, 5 muy gorda, según lo descrito por Hoedemaker et al. (2009), fueron seleccionadas.

Los animales recibieron manejo sanitario similar previo al experimento. La alimentación se basó en una mezcla forrajera de gramíneas y leguminosas que en primera instancia tubo una edad fenológica de 28 días y luego los animales consumieron esta misma mezcla forrajera, pero la edad fenológica del potrero fue de 42 días; además, se brindó agua y sales minerales *ad libitum*.

### 4.2.3 Diseño experimental

El estudio fue de carácter experimental, donde se valoró dos edades fonológicas de la fibra del potrero como fuentes de alimentación (28 días y 42 días) y como estas influían sobre la actividad ovárica. Cuando las vacas consumieron el pasto con edades fonológicas de 28 y 42 se les administró hormona Folículo-estimulante (250 UI) vía Epidural en una sola dosis. Para el estudio se determinó los siguientes tratamientos:

T0=pasto con fibra de 28 días de edad fonológica (n=8)

T1=pasto con fibra de 28 días de edad fonológica + administración de 250 UI de FSH en el protocolo de la OPU (n=8)

T2=pasto con fibra de 42 días de edad fonológica (n=8)

T3=pasto con fibra de 42 días de edad fonológica + administración de 250 UI de FSH en el protocolo de la OPU (n=8)

Las variables dependientes valoradas fueron:

- Composición botánica de los pastos
- Análisis químico de los pastos
- Número y tamaño de folículos presentes en los ovarios
- Número y calidad de los COC's recuperados por OPU

### Metodología.

Para determinar la proporción de gramíneas y leguminosas, contenido nutricional y niveles de fibra, se procedió a realizar aforo del potrero y análisis químico de la pastura en estudio (28 y 42 días), la determinación de materia seca se realizó en el laboratorio de bromatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca y el análisis químico de las muestras en un laboratorio particular (SETLAB, Riobamba, Ecuador), Para la estimación de la franja diaria se basó en el método de la estimación de la oferta diaria de la pradera, lo que corresponde a la cantidad de forraje disponible (Kg de MS) por animal al inicio del pastoreo (Canto et al., 2012).

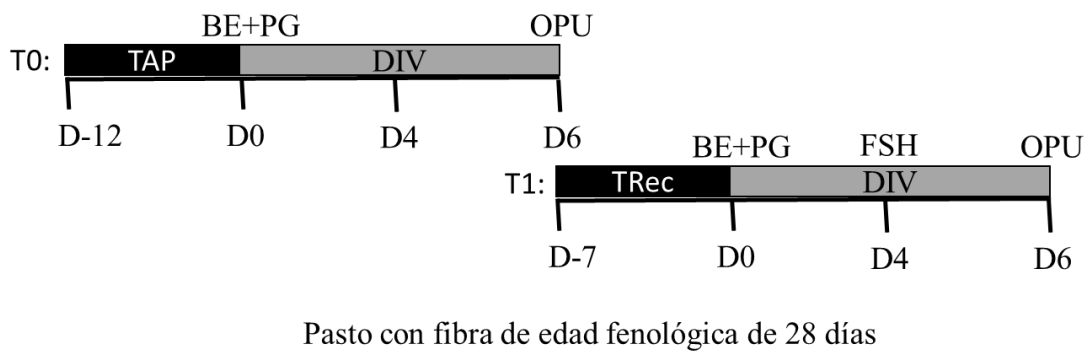
### Tratamientos:

#### *Protocolo del tratamiento cero (T0)*

Inicialmente se proporcionó 12 días de adaptación a los animales en un potrero con fibra que corresponde a 28 días de edad de la pastura. El día 12 pasó a ser considerado el día cero del protocolo, en el cual los animales recibieron 0,4 mg de Benzoato de Estradiol (IM) más 25 mg de Prostaglandina (IM) y se aplicó un dispositivo intravaginal de 0,9 g de progesterona (CIDR). La OPU se realizó el día 6 del protocolo (**Fig. 5**).

*Protocolo del tratamiento uno (T1)*

Luego de un receso de 7 días, las 8 vaquillas continuaron su alimentación con fibra que corresponde a 28 días de edad de la pastura. El día cero del protocolo recibieron 0,4 mg Benzoato de Estradiol (IM), más 25 mg de Prostaglandina (IM) y se aplicó un dispositivo intravaginal de 0,9 g de progesterona (CIDR). En este tratamiento el día 4 del protocolo se administró 250 UI de FSH (Pluset), vía epidural. La OPU fue realizada el día 6 del protocolo (**Fig. 5**).



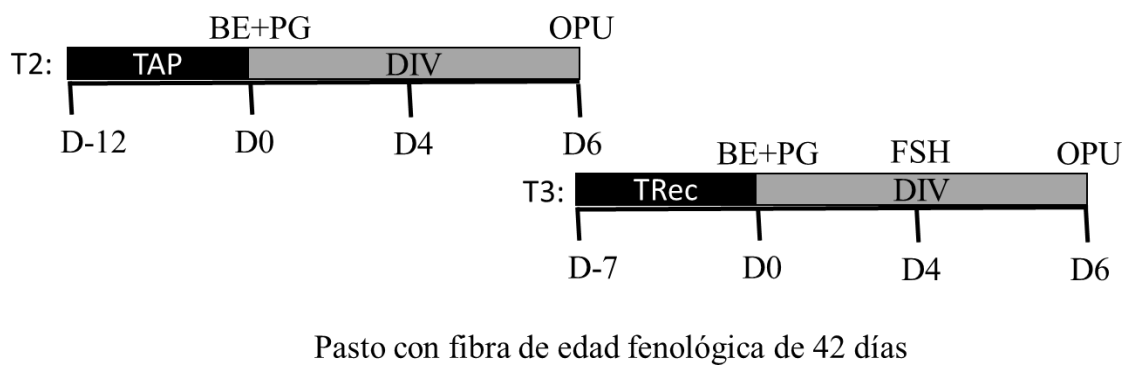
**Figura 5.** Protocolos de los tratamientos 0 (T0) y 1 (T1) desarrollados en praderas con fibra de 28 días de edad fenológica. TAP= tiempo de adaptación de las vaquillas al pasto previo a las sesiones de OPU. BE=Benzoato de estradiol. PG=prostaglandina. DIV=dispositivo intravaginal de progesterona. OPU=Sesión de aspiración ecoguiada. TRec=tiempo de receso entre sesiones de OPU. FSH=hormona foliculoestimulante.

*Protocolo del tratamiento dos (T2)*

Terminado los tratamientos 0 y 1, se realizó un receso de 30 días para iniciar con el protocolo de los experimentos 2 y 3, en el cual los animales consumieron pasto con fibra de 42 días de edad fenológica. Las vaconas ingresaron al potrero 12 días antes de iniciar el protocolo al cual se determinó como periodo de acostumbamiento. El siguiente día fue considerado día cero del protocolo y recibieron 0,4 mg Benzoato de Estradiol (IM), más 25 mg de Prostaglandina (IM) y se aplicó un dispositivo intravaginal de 0,9 g de progesterona (CIDR). La OPU fue realizada el día 6 del protocolo (**Fig. 6**).

*Protocolo del tratamiento 3 (T3)*

Luego de un receso de 7 días, las vaquillas ingresaron al tratamiento 3, en el día cero recibieron 0,4 mg Benzoato de Estradiol (IM), más 25 mg de Prostaglandina (IM) y se aplicó un dispositivo intravaginal de 0,9 g de progesterona (CIDR). El día 4 del protocolo se administró 250 UI de FSH vía epidural. La OPU fue realizada el día 6 del protocolo (**Fig. 6**).



**Figura 6.** Protocolos de los tratamientos 2 (T2) y 3 (T3) desarrollados en praderas con fibra de 42 días de edad fenológica. TAP= tiempo de adaptación de las vaquillas al pasto previo a las sesiones de OPU. BE=Benzoato de estradiol. PG=prostaglandina. DIV=dispositivo intravaginal de progesterona. OPU=Sesión de aspiración ecoguiada. TRec=tiempo de receso entre sesiones de OPU. FSH=hormona folículoestimulante.

#### *Valoración del número y tamaño de folículos*

La determinación del número de folículos se realizó previo a cada sesión de OPU (día 6), de acuerdo a la metodología descrita por Ayala et al. (2019), quienes indican que se debe realizar un barrido latero media, dorso ventral del ovario derecho y luego el izquierdo, para determinar el número y el tamaño de cada uno de los folículos existentes en los ovarios. Con la información obtenida se formaron grupos: G1=folículos < 4 mm; G2=folículos entre 4-8 mm; G3=folículos >8 mm.

#### **4.2.4 Aspiración ecoguiada (OPU):**

##### Preparación de las vaquillas para las sesiones de OPU

Los animales fueron colocados en una manga (Brete PLUS, Ecuador) cumpliendo las normas de bioseguridad, tanto del operador como del animal. La parte posterior de la vaquilla fue lavada con agua y amonio cuaternario al 10%. Luego se aplicó por vía epidural (última sacra y primera coccígea) una mezcla de lidocaína al 2% (Roxicaina®) y xilacina al 2% (Overxil).

Los ovarios se visualizaron mediante ecografía (Prosound 2, Aloka, Japón) y se contaron todos los folículos antrales. Luego se procedió a la aspiración transvaginal de los folículos utilizando un escáner de ultrasonido portátil (Prosound 2, Aloka, Japón), equipado con un transductor sectorial de 5 megahertz (MHz) ensamblado en un soporte de sonda. Para la punción se utilizó una aguja hipodérmica desechable (1,2 x 75 mm) conectada en un extremo a un tubo cónico de 50 mL y el otro a una bomba de vacío (WTA BV 003D, Brasil) con una presión regulada a 70 mm de mercurio (mm·Hg).



#### 4.2.5 Valoración de los COC's

La búsqueda y clasificación de los COC's se realizó en un estereoscopio (SMZ 745, Nikon, Japón), en base a los criterios previamente descritos Ayala et al. (2020). Brevemente, COC's de calidad A: apariencia compacta, con múltiples capas (más de 4 capas) de células de cúmulo, citoplasma granular uniforme y transparente; calidad B: con 1 a 3 capas de células del cúmulo que cubrían la zona pelúcida, con citoplasma opaco, total o parcialmente homogéneo y finamente granuloso; calidad C: parcial o totalmente desnudos, citoplasma con áreas oscuras irregulares; calidad D: células del cúmulo completamente expandidas y decoloradas. Finalmente, los COC's fueron agrupados en aptos (calidad A y B) y no aptos (calidad C y D) según lo descrito por Ayala et al. (2020).

#### 4.3 Análisis estadístico

Los datos fueron procesados en el software Excel y analizados en el programa estadístico SPSS®. Se determinó normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para determinar diferencia entre la composición química del pasto se utilizó la prueba de T de Student. Para valorar el número de folículos presentes en el momento de la OPU y la cantidad y calidad de COC's recuperados se utilizó un ANOVA y para comparar las medias la prueba de Tukey al 5%. Para determinar el porcentaje de folículos de diferentes tamaños presentes en el momento de la OPU se utilizó la prueba de Chi cuadrado.

### 5. Resultados y discusión

El análisis de la composición botánica del pasto determinó que la mezcla forrajera estaba constituida principalmente por gramíneas (80,08%) de las cuales se observa en mayor porcentaje el Ray Grass (*Lolium sp* en un 47,2%), Kikuyo (*Pennisetum clandestinum* 17,8%), Holco (*Holcus lanatus* 12,6%) y Poa (*Poa pratensis* en un 2,5%). Las leguminosas están representadas por el trébol blanco (*Trifolium repens* en un 7,4%) y otros que son descritos en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Composición botánica de la pradera.

Nombre	Porcentaje
<i>Lolium spp</i>	47,2%
<i>Pennisetum clandestinum:</i>	17,8%
<i>Holcus lanatus:</i>	12,6%
<i>Trifolium repens</i>	7,4%
<i>Poa pratensis:</i>	2,5%
Otros:	6,4%
<i>Materia Muerta:</i>	6%

En la **Tabla 2**, se puede observar que los niveles de fibra bruta no son significativamente diferentes, cuando la mezcla forrajera es consumida a los 28 y 42 días de edad ( $P > 0,005$ ), sin embargo, el pasto de 28 días tiene valores superiores de humedad, proteína bruta y cenizas con respecto al pasto de 42 días (4%, 1,9% y 3,7% respectivamente;  $P < 0,05$ ). Por lo tanto, a los 42 días, el pasto al tener un menor porcentaje de humedad, la cantidad de materia seca fue superior en un 3,5%, de igual manera al poseer una menor concentración de cenizas, aumenta su contenido de materia orgánica en 2%.

**Tabla 2.** Composición nutricional de la pradera de 28 y 42 días de edad fenológica.

	Pastura 28 días	Pastura 42 días	P
	$\bar{x} \pm EE$	$\bar{x} \pm EE$	
Humedad (%)	88,3±0,70	84,9±0,55	0,002
Materia seca (%)	11,6±0,73	15,1±0,55	0,002
Proteína Bruta (%)	21,3±0,81	17,6±0,86	0,008
Fibra Bruta (%)	29,1±0,54	30,7±0,69	0,093
FDN	48,7±0,94	53,9±0,31	0,036
FDA	29,7±0,50	34,8±0,17	0,041
LDA	4,2±0,29	5,0±0,02	0,111
Grasa (%)	2,1±0,21	1,8±0,08	0,150
Cenizas (%)	13,5±0,31	11,6±0,38	0,002
Materia Orgánica (%)	86,5±0,31	88,5±0,47	0,003

FDN=fibra detergente neutra. FDA=fibra detergente ácida. LDA=lignina ácido detergente. Prueba de T de Student.

La pradera de 28 días de edad contiene una mayor humedad en comparación con la pradera de 42 días, no obstante, la materia seca experimenta un incremento a los 42 días. Esto está directamente relacionado con una mayor acumulación de biomasa en la planta, ya que a medida que madura, la cantidad de materia seca tiende a aumentar (Villalobos & Sánchez, 2009). A pesar de la mayor cantidad de materia seca, la calidad nutricional del forraje puede variar, incluyendo aspectos como en la cantidad de proteína, fibra, grasa y componentes inorgánicos (Nieto et al., 2017).

Los niveles de proteína bruta a los 28 días de edad, obtenidos en este estudio (**Tabla 2**), difieren de otras investigaciones, como la realizada por Portillo et al. (2021). En su estudio, al utilizar una mezcla con el 90% de gramíneas (*Lolium spp*) y 10% de leguminosas (*Trifolium repens*) en épocas de alta y baja precipitación, cultivados en suelos andinos sobre los 2900 msnm, se observaron valores de proteína bruta de 17,91 y 20,29 % respectivamente, estos valores resultan inferiores a los obtenidos en el presente estudio. La cantidad de proteína bruta al día 42, disminuye con respecto al pasto de 28 días en un 4%. Estos datos son respaldados por Portillo et al. (2021), cuyo estudio también observa una marcada disminución en los niveles de proteína bruta. Sin embargo, los niveles presentados en este estudio son superiores (17,6 vs 14,63%) con respecto al trabajo mencionado. Probablemente esta diferencia pueda ser explicada por el uso de otras gramíneas en este estudio, como *Penisetum clandestinum* con un 17,8% de presencia (**Tabla 1**), cuyos valores de proteína

cruda pueden superar el 20% en condiciones de cultivo ideales (Correa et al., 2012), lo que podría mejorar la composición nutricional de la pastura.

La cantidad de Fibra cruda, FDN, FDA y LDA no muestran diferencias significativas en la pradera de 28 y 42 días de edad fenológica. Sin embargo, la cantidad de FDN y FDA son buenos indicadores del nivel de fibra presente en la dieta de rumiantes. De hecho, de acuerdo a la clasificación de alimentos propuesto por (Rocateli & Zhang, 2017), alimentos con FDN y FDA menores al 41 y 31% respectivamente, se los puede clasificar como alimentos de excelente calidad, mientras que, valores entre el 54 y 60% aseguran un consumo sobre el 2% de peso vivo. En este estudio la pradera de 28 días tuvo un 48,55 % FDN y 28,88% FDA, mientras que a los 42 días los valores mostraron 48,54% FDN y 33,23% FDA. Resultados que están ligeramente sobre los propuestos como praderas de excelente calidad, sin embargo, aseguró un consumo adecuado de materia seca en las vaquillas de estudio en los dos momentos de consumo (28 y 42 días).

La cantidad y cenizas, tuvieron un comportamiento similar al de humedad y materia seca, puesto que a medida que disminuye la cantidad de cenizas, incrementa la cantidad de materia orgánica. En el pasto de 28 días se evidenció una mayor cantidad de cenizas que a los 42 días. Por otro lado, a los 42 días fue mayor la cantidad de materia orgánica. Esto puede explicarse por un aumento también en la cantidad de materia presente, puesto que la concentración de cenizas es relativamente constante, pero puede disminuir en comparación a la cantidad materia seca cuando esta aumenta (Villalobos & Sánchez, 2009).

### 5.1 Promedios generales previo a la OPU

La media general de folículos visualizados el día de la OPU, sin considerar tratamientos fue de  $20 \pm 1,07$  folículos, de estos se llegó a aspirar un 76% ( $15,2 \pm 1,11$  folículos visualizados) y se recuperó un 60,5% de COC's ( $12,1$  COC's), al clasificar el 56,2% fueron aptos y el 43,8% no aptos para la producción de embriones *in vitro* (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Media y desviación estándar general del número de folículos visualizados, aspirados, complejos cúmulo ovocito recuperados (COC's), aptos, no aptos y porcentaje de recuperación en el total de sesiones de OPU realizadas en el estudio.

	Sesiones	$\bar{x}$	DE	Mínimo	Máximo
<i>Folículos visualizados</i>	32	20	6,08	9	34
<i>Folículos aspirados</i>	32	15,2	6,32	6	30
<i>COC's recuperados</i>	32	12,1	6,8	4	26
<i>% de recuperación</i>	32	60,5			
<i>COC's aptos</i>	32	6,8	4,9	1	20
<i>COCs no aptos</i>	32	5,3	3,3	1	14

$\bar{x}$  =media. DE error estándar. COC's= complejo cumulo ovocito.

El promedio de folículos visualizados ( $20 \pm 1,07$  folículos) es superior al descrito por en vaquillas de genotipo Holstein mestizas en el trópico alto del Ecuador ( $17,31$  folículos), al momento de realizar la OPU (Dután et al., 2023). Sin embargo, concuerda con el recuento de folículos antrales realizado en ovarios de camal procedentes de animales del trópico alto del Ecuador ( $20,5$  folículos) realizado por este grupo de investigación mediante la técnica de ecografía (Ayala et al., 2023).

El porcentaje de recuperación ( $60,5\%$ ) obtenido en el total de las sesiones de OPU se encuentra dentro de los promedios descritos por varios autores (Sakaguchi et al., 2019; Dután et al., 2023;  $65,7\%$  y  $57,23\%$  respectivamente).

## 5.2 Media del número de folículos y calidad de COC's recuperados en las sesiones de OPU en cada uno de los tratamientos

El número de folículos visualizados el día de la OPU fue similar en los tratamientos ( $T_0=20,8 \pm 2,45$  folículos;  $T_1=21,4 \pm 2,13$  folículos;  $T_2=16,3 \pm 2,21$ ;  $T_3=21,6 \pm 2,56$  folículos). Esto confirma que el número de folículos antrales en los bovinos es una característica repetible en cada una de las ondas foliculares (J. L. H. Ireland et al., 2008), por lo que no se vería afectada por la administración de la hormona Folículo-estimulante ya que su función es estimular el desarrollo de los folículos que están presentes en los ovarios en un momento determinado y no predisponer la presencia de un mayor número de folículos para que ingresen a la fase de reclutamiento (Ireland et al., 2011).

El número de folículos aspirados fue similar en  $T_0$  (testigos) de las praderas de 28 días y  $T_2$  (testigo) de las praderas de 42 días ( $T_0=12,3 \pm 1,95$  folículos;  $T_2=10,9 \pm 2,05$  folículos). Igual se observó entre los tratamientos que recibieron FSH ( $T_1=18,8 \pm 2,27$  folículos y  $T_3=18,9 \pm 1,12$  folículos). Si bien entre los tratamientos testigos ( $T_0$  y  $T_2$ ) y los que recibieron hormona ( $T_1$  y

T3) no existe diferencia estadística ( $P>0,05$ ), se puede observar una diferencia numérica interesante que llega casi al doble, lo cual nos lleva a pensar que la FSH al estimular el desarrollo del folículo permite el crecimiento del mismo haciendo que este alcance mayor tamaño y sea más fácil su aspiración (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Media y error estándar de los folículos visualizados, aspirados, complejos cúmulo ovocito recuperados (COC's), aptos, no aptos y porcentaje de recuperación en el total de sesiones de OPU realizadas en el estudio en cada uno de los tratamientos.

	T0	T1	T2	T3
	$\bar{x} + EE$	$\bar{x} + EE$	$\bar{x} + EE$	$\bar{x} + EE$
<i>Folículos Visualizados</i>	20,8±2,45	21,4±2,14	16,3±2,21	21,6±1,48
<i>Folículos aspirados</i>	12,3±1,95a	18,8±2,27b	10,9±2,05a	18,9±1,12b
<i>COC's aptos</i>	2,8±0,67a	9,8±1,92b	3,4±1,06a	10,4±1,46b
<i>COC's no aptos</i>	6,8±1,42	3,8±1,06	5,4±1,41	5,4±0,49
<i>Total colectados</i>	10,5±2,07	13,5±2,75	8,8±2,41	15,8±1,85
<i>% de recuperación</i>	50,6%	63,2%	53,8%	71,4%

Tratamientos: T0= testigo pasto de 28 días. T1=250 UI de FSH vía Epidural. T2=Testigo pasto 42 días. T3= 250 IU FSH vía Epidural. Prueba de Tukey al 5%. Letras diferentes indica diferencia estadística entre filas (tratamientos).

El porcentaje de recuperación de COC's muestra que la aplicación de 250 UI de FSH administrada vía epidural a vaquillas que fueron alimentadas con pasto de 42 días permitió una recuperación del 17,6% más de COC's que su testigo (T2) y de un 8,2% con relación a los animales que si bien recibieron 250 UI de FSH fueron alimentados con pasto de 28 días (T1). Pero algo muy importante es que al administrar 250 UI de FSH a los animales que consumieron pasto de 42 días (T3) se obtuvo 3 veces más COC's aptos para la PIVE en comparación con su testigo (T2); sin embargo, aplicar 250 UI a los animales que consumieron pasto de 28 días también permitió mejorar los COC's aptos para la PIVE en proporciones similares estadísticamente que los de T3, por lo tanto, se considera que el administrar 250 UI mejora *per se* el número de folículos aspirados y la calidad de COC's recuperados.

Existen información que describen porcentajes similares de recuperación de COC's tanto al administrar FSH (20,5 COC's) como en los tratamientos control (16 COC's), por vía intramuscular (Oliveira et al., 2016). Sin embargo, Sakaguchi et al. (2018), mencionaron que la administración de 400 mg FSH por vía Epidural ( $17,7 \pm 9,7$  COC's), permite obtener cantidades similares de COC's que al estimular con FSH por vía IM ( $16,5 \pm 7,3$  COC's). En

el presente estudio al administrar 250 UI de FSH permite tener resultados similares al obtenido en los estudios antes mencionados.

**5.3 Resultados del número de folículos y calidad de los COC's de acuerdo al tamaño de los folículos presentes en el momento de la OPU**

Los folículos al momento de la OPU fueron clasificaron en tres grupos: Grupo 1 (<4mm); Grupo 2 (4-8 mm) y Grupo 3 (>8 mm).

Al analizar el número y porcentaje de folículos de los grupos (G1=< 4 mm; G2 entre 4-8 mm; G3= > 8 mm) presentes al momento de la OPU en cada tratamiento (T0; T1; T2; T3), se determinó que en los tratamientos T1 y T3 no se observó folículos menores a 4 mm y que los folículos entre 4 y 8 mm superaban el 78% del total de los visualizados y que el porcentaje de folículos mayores a 8 mm en T1 fue del 8%, en T3 subió al 22,1% (**Tabla 5**). Los resultados demuestran que la administración de FSH vía epidural en dosis única de 250 UI estimula el ovario proporcionando una tercera parte de folículos homogéneos, con un tamaño dentro de lo recomendado para ser aspirados (Ruiz et al., 2013).

**Tabla 5.** Porcentaje de folículos de cada grupo (<4mm; entre 4-8mm; >8mm) presentes en cada uno de los tratamientos en todas las sesiones de OPU realizadas en el estudio.

	<4mm	4-8mm	>8mm
T0	30 (18,1%)a	116 (69,9%)b	20 (12,0%)a
T1	0 (0,0%)a	156 (91,2%)b	15 (8,8%)a
T2	99 (76,2%)c	29 (22,3%)b	2 (1,5%)a
T3	0 (0,0%)a	120 (77,9%)c	34 (22,1%)b

Grupos de folículos: Grupo 1=<4mm. Grupo 2= entre 4-8mm. Grupo 3=>8mm, organizados con la información obtenida en los tratamientos: T0= testigo pasto de 28 días. T1=250 UI de FSH vía Epidural. T2=Testigo pasto 42 días. T3= 250 IU FSH vía Epidural. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Letras diferentes indican diferencia entre filas.

Los animales que fueron alimentados con pradera de 28 días de edad fenológica y no recibieron hormona mostraron tres veces más folículos entre 4-8 mm a pesar de no recibieron hormona, consideramos que es podría estar ligado a la composición química de la fibra de la pradera de 28 días el cual presenta 21,3% de proteína lo cual influye en el desarrollo folicular (Armstrong et al., 2001). En contraposición, en el tratamiento 2 los animales mostraron apenas un 22,3% de folículos con tamaño entre 4-8 mm, pero los folículos con tamaño < 4 mm pasaron el 76%, lo cual ratifica la teoría de la proteína pues esta pradera contaba con un porcentaje de proteína del 17,6%, lo cual influiría directamente sobre la producción de la

hormona folículo estimulante endógena del animal, generando que los folículos no crezcan como en T0.



### Conclusiones

- La pradera del pasto de 28 días de edad fenológica posee mayor porcentaje de humedad, proteína y cenizas, particularidades propias de la edad fenológica, que conforme avanza la misma va disminuyendo, lo cual afecta la cantidad y tamaño de los folículos observados el día de la OPU.
- Administrar 250 UI de hormona Folículo-estimulante vía epidural en una sola dosis estimula el desarrollo de los folículos antrales a un tamaño entre 4-8 mm en 48 horas posteriores.
- Alimentar donadoras con praderas de 28 días de edad fenológica previo a aplicar un protocolo en el cual se administre 250 UI de FSH permite recuperar mayor número y calidad de COC's para la producción de embriones *in vitro*.

## Recomendaciones

- Analizar la utilización de pradera con mayor edad fenológica (60 días) como utilizan en ganaderías pequeñas.
- Realizar un muestreo serológico para determinar hormonas y metabolitos con el fin de explicar los cambios en la cantidad y calidad de los folículos y COC´s obtenidos en la OPU.

## Referencias

- Adamiak, S. J., Mackie, K., Watt, R. G., Webb, R., & Sinclair, K. D. (2005). Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology of Reproduction*, 73(5), 918–926. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041483>
- Adams, G. P., & Singh, J. (2014). Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. In *Bovine Reproduction* (Primera, pp. 219–244). <https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch24>
- Alvarez, P., Spicer, L. J., Chase, C. C., Payton, M. E., Hamilton, T. D., Stewart, R. E., Hammond, A. C., Olson, T. A., & Wettemann, R. P. (2000). Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science*, 78(5), 1291–1302.
- Armstrong, D. G., McEvoy, T. G., Baxter, G., Robinson, J. J., Hogg, C. O., Woad, K. J., Webb, R., & Sinclair, K. D. (2001). Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: Associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biology of Reproduction*, 64(6), 1624–1632. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1624>
- Ayala, L.E; Pesantez, J.L; Rodas, E.R; Dutan, J.B; Calle, G.R; Murillo, Y.A; Vázquez, J.M; Nieto, P.E; Ortega, V.V; Samaniego, J. X. (2019). Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Archivos de Zootecnia*, 68(262), 186–192.
- Ayala G., L., Samaniego C., J., Nieto E., P., Rodas C., R., Dutan S., J., Calle Or., G., Murillo A., Y., Vazquez M., J., Argudo G., D., & Perea G., F. (2018). Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 552. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.13816>
- Ayala Guanga, L., Samaniego Campoverde, J., Argudo Garzón, D., Perea Brugal, M., Perea Ganchou, F., Rodas Carpio, E., & Nieto Escandón, P. (2020). El intervalo de tiempo entre la estimulación ovárica con FSH/LH y la colecta afecta la cantidad, calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos recuperados de novillas criollas ecuatorianas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(1), e17571. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17571>
- Ayala, L., Dutan, J., Samaniego, J., Jácome, A., Garay, G., Rodas, R., & Astiz, S. (2023). Accuracy of ultrasound and visual inspection in antral follicular count in crossbred Holstein cows raised under grazing systems at high altitude. *Reproduction in Domestic*

*Animals*, 00(August), 1–4. <https://doi.org/10.1111/rda.14488>

Chagas, L. M., Bass, J. J., Blache, D., Burke, C. R., Kay, J. K., Lindsay, D. R., Lucy, M. C., Martin, G. B., Meier, S., Rhodes, F. M., Roche, J. R., Thatcher, W. W., & Webb, R. (2007). Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4022–4032. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-852>

Chasombat, J., Nagai, T., Parnpai, R., & Vongpralub, T. (2014). Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native (*Bos indicus*) heifers. *Animal Science Journal*, 85(1), 15–24. <https://doi.org/10.1111/asj.12086>

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>

Correa, C., Rodríguez, Y., Pabón, M., & Charulla, J. (2012). Efecto de la oferta de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) sobre la producción, la calidad de la leche y el balance de nitrógeno en vacas Holstein Effect of offer level of Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) on production, milk quality and nit. *Livestock Research for Rural*, 24(11).

Dután, J., Samaniego, J., Perea, F., Hernández-Fonseca, H., Pesántez, J. L., Jácome, A., Garay, G., & Ayala, L. (2023). Relación de la hormona anti-mülleriana con la cantidad y calidad de ovocitos colectados por aspiración ecoguiada en vaquillas Holstein. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, X(1), 1–7. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e33202>

Farías-Delgado, M. G., Zambrano, J. J., Jácome-Aucay, A. S., Dután-Sanango, J. B., Garay-Peña, G. S., & Ayala-Guanga, L. E. (2023). Efecto de la hormona Folículo-estimulante administrada vía epidural, sobre la respuesta ovárica y el perfil hormonal en vacas Holstein. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, XXXIII(2), 1–7. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e33253>

Ginther, O. J. (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. J. (2019). Intraovarian spatial and vascular harmony between follicles and corpus luteum in monovulatory heifers, mares, and women. *Theriogenology*, 128, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.019>

Gutiérrez León, F. A., Estrella, A., Irazábal, E., Quimiz, V., Portilla, A., & Bonifaz, N. (2018).

Mejoramiento de la eficiencia de la proteína de los pastos en bovinos de leche utilizando cuatro formulaciones de balanceados. *La Granja*, 28(2), 115–122. <https://doi.org/10.17163/lgr.n28.2018.09>

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>

Ireland, J. J. A., Smith, G. W. B., Scheetz, D. A., & Folger, J. K. A. (2011). Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(2), 1–14. <https://doi.org/10.1071/RD10226>

Ireland, J. L. H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A. P. N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G. W., Perez, G. I., Evans, A. C. O., & Ireland, J. J. (2008). Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. *Biology of Reproduction*, 79(6), 1219–1225. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>

Martinez, M. F., Sanderson, N., Quirke, L. D., Lawrence, S. B., & Juengel, J. L. (2016). Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology*, 85(3), 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.026>

Nieto, P., Ayala, L., Dután, J., Rodas, E., Vázquez, J., Murillo, Y., Calle, G., & Samaniego, J. (2017). Composición botánica de los pastizales en la provincia del Azuay-Ecuador. *MASKANA, Producción Animal*, 1–3.

Portillo-López, P. A., Meneses-Buitrago, D. H., Lagos-Burbano, E., Duter-Nisivoccia, M. E., & Castro-Rincón, E. (2021). Nutritive value of forage mixtures in the dry and rainy seasons in Nariño, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 32(2), 556–572. <https://doi.org/10.15517/am.v32i2.43207>

Rocateli, A., & Zhang, H. (2017). Forage quality interpretations. *Oklahoma Cooperative Extension Service, PSS-2117*, 1–4.

Rodas, E., Ayala, L., Gonzales, J., Nieto, P., Pesántez, M., Vázquez, J., Murillo, Y., Pesantez, J., Serpa, V., Soria, M., Calle, G., Dután, J., & Samaniego, X. (2017). Efecto del tamaño

de la finca y del sistema de manejo sobre la edad al primer parto en ganaderías lecheras de la provincia del Azuay , Ecuador. *MASKANA, Producción Animal-2017*, 125–127.

- Ruiz, S. (2015). *OVUM PICK UP (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción*. 58–63.
- Ruiz, S., Romero-Aguirregomezcorra, J., Astiz, S., Peinado, B., Almela, L., & Poto, A. (2013). Application of reproductive biotechnology for the recovery of endangered breeds: Birth of the first calf of murciana-levantina bovine breed derived by opu, in vitro production and embryo vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6). <https://doi.org/10.1111/rda.12179>
- Sakaguchi, K., Ideta, A., Yanagawa, Y., Nagano, M., Katagiri, S., & Konishi, M. (2018). Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black cows. *Journal of Reproduction and Development*, 64(5), 451–455.
- Sakaguchi, K., Yanagawa, Y., Yoshioka, K., Suda, T., Katagiri, S., & Nagano, M. (2019). Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0534-3>
- Sinclair, K. D., Kuran, M., Gebbie, F. E., Webb, R., & McEvoy, T. G. (2000). Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *Journal of Animal Science*, 78(10), 2670–2680. <https://doi.org/10.2527/2000.78102670x>
- Tovío, N. (2012). Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. *Spei Domus*, 8(17), 38–47.
- Vierira, L. M., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., Guerreiro, B. M., Silveira, C. R. A., Moreira, R. J. C., Sá Filho, M. F., Bó, G. A., Mapletoft, R. J., & Baruselli, P. S. (2014). Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve invitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 82(2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.013>
- Villalobos, L., & Sánchez, J. M. (2009). Evaluación agronómica y nutricional del pasto ryegrass perenne tetraploide (*Lolium perenne*) producido en lecherías de las zonas altas de Costa Rica. II . Valor nutricional. *Agronomía Costarricense*, 34(1), 43–52.

<https://doi.org/10.15517/rac.v34i1.6698>

Wu, Y. G., Liu, Y., Zhou, P., Lan, G. C., Han, D., Miao, D. Q., & Tan, J. H. (2007). Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: A study using the mouse model. *Cell Research*, 17(8), 722–731. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.66>

Xu, J., Bishop, C. V., Lawson, M. S., Park, B. S., & Xu, F. (2016). Anti-Müllerian hormone promotes pre-antral follicle growth, but inhibits antral follicle maturation and dominant follicle selection in primates. *Human Reproduction*, 31(7), 1522–1530. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew100>



## Anexos



Anexo A. Vaquillas del ensayo



Anexo B. Aplicación de FSH vía epidural

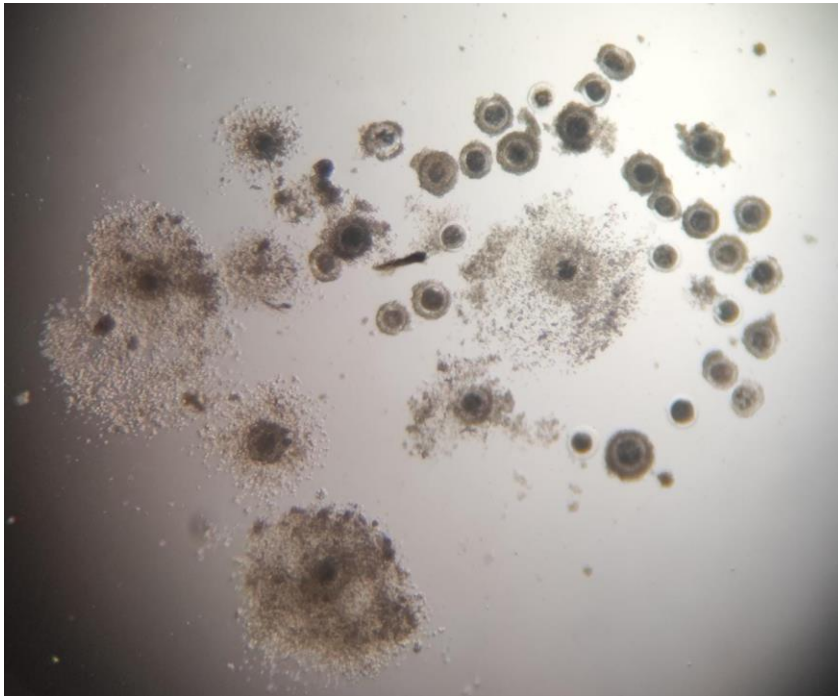




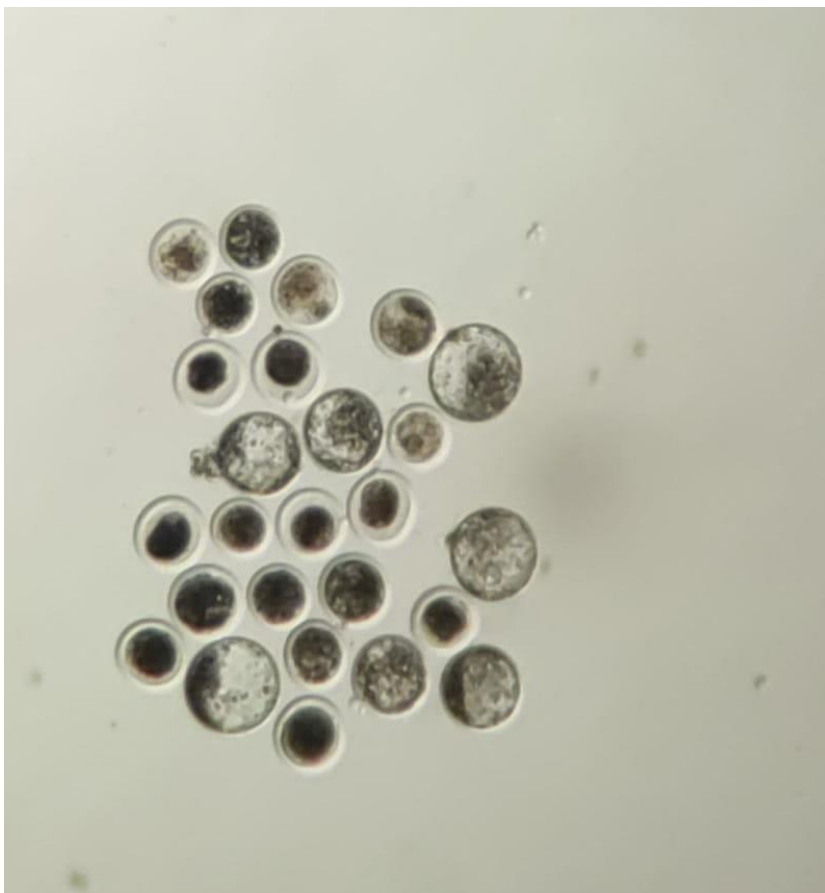
Anexo C. Valoración de los folículos antes de la OPU



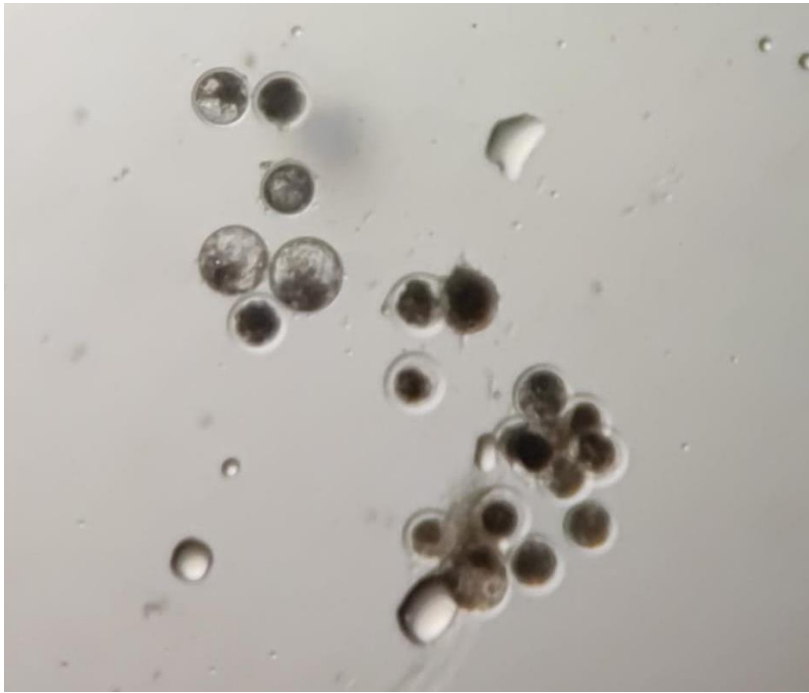
Anexo D. COC's recuperados de T1



Anexo E. COC's recuperados de T3



Anexo F. Embriones de T1



Anexo G. Embriones de T3